

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE
Dipartimento di Chimica Fisica e Inorganica

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale
Classe LM-71 – Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Sviluppo di un metodo elettrochimico per la determinazione della Capacità Antiossidante

Tesi di laurea sperimentale

Presentata da :

Relatore:

Pietro Matteucci

Prof.ssa Domenica Tonelli

Co-relatore:

Dott. Isacco Gualandi

Il sessione

Anno Accademico 2011/2012

ACRONIMI UTILIZZATI

- **AAPH**: 2,2'-azobis(2-aminidinopropane)hydrochloride (2-2'azobis-2-aminidinopropano cloridrato);
- **ABTS**: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (acido 2,2'-azinobis(3-eilbenzotiazoline-6-solfonico));
- **AE**: antiradical efficiency (efficienza antiradicalica);
- **AOA**: anti oxidant activity (attività antiossidante);
- **AOC**: anti oxidant capacity (capacità antiossidante);
- **AUC**: area under the curve (area sottesa dalla curva);
- **BDE**: bond dissociation enthalpy (entalpia di dissociazione del legame);
- **CA**: chronoamperometry (cronoamperometria);
- **CE**: counter electrode (contro elettrodo);
- **CV**: cyclic voltammetry (voltammetria ciclica);
- **DPPH**: 2,2-diphenil-1-picrylhydrazil (2,2-difenil-1-picrilidrazile);
- **EC₅₀**: efficient concentration (concentrazione effettiva per avere un calo del segnale del 50%)
- **ET**: electron transfer (trasferimento elettronico)
- **F-C**: Folin-Ciocalteu
- **FRAP**: ferric ion reducing antioxidant power (potere antiossidante basato sulla riduzione dello ione ferrico);
- **FT-IR**: Fourier transform- infrared (spettro infrarosso in trasfromata di Fourier);
- **GAE**: gallic acid equivalent (acido gallico equivalente);
- **GC**: glassy carbon (carbone vetroso);
- **HAT**: hydrogen atom transfert (trasferimento di atomo di idrogeno);
- **HPLC-MS**: high performance liquid chromatography- mass spectrometry (cromatografia liquida ad alta prestazione con spettrometro di massa);
- **ORAC**: oxygen radical absorbance capacity (capacità di assorbimento dei radicali all'ossigeno)
- **RE**: reference electrode (elettrodo di riferimento);
- **ROS**: reactive oxygen species (specie reattive all'ossigeno);
- **SAM**: self-assembled monolayer (monostrato auto-assemblato);
- **SCE**: saturated calomel electrode (elettrodo al calomelano saturo);
- **SHE**: standard hydrogen electrode (elettrodo standard ad idrogeno);

- **TEAC**: Trolox[®] equivalent antioxidant capacity (capacità antiossidante come Trolox[®] equivalente);
- **TRAP**: total radical trapping parameter (parametro di intrappolamento totale dei radicali)
- **VCEAC**: Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (capacità antiossidante come Vitamina C equivalente);
- **WE** : working electrode (elettrodo di lavoro).

SOMMARIO

CAPITOLO 1	10
RADICALI LIBERI E ANTI-OSSIDANTI	10
1.1) Concetto di “radicale libero”.	10
1.2) Specie reattive dell’ossigeno (ROS).	11
1.3) Concetto di Antiossidante.	15
1.4) Classificazione degli Antiossidanti	17
1.4.1) Antiossidanti interruttori di catena (chain-breaking).	18
1.4.2) Antiossidanti Preventivi ed Esogeni.	19
1.5) Antiossidanti Esogeni	20
1.5.1) Antiossidanti Vitaminici.	20
1.5.2) Antiossidanti non vitaminici.	23
1.5.2.1) Polifenoli.	23
1.5.2.2) I Flavonoidi	23
1.5.2.3) Acidi Fenolici.	27
CAPITOLO 2	31
METODICHE ANALITICHE STANDARD PER LA DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA’ ANTIOSSIDANTE (AOC).	31
2.1) Metodo ORAC.	35
2.2) Metodo FRAP.	41
2.3) Metodo TRAP.	42
2.4) Metodo ABTS-TEAC.	44
2.5) Metodo DPPH.	46
2.6) Metodo di Folin-Ciocalteu.	48
2.7) Approccio Potenzimetrico alla misura dell’AOC.	50
CAPITOLO 3	52
DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA’ ANTIOSSIDANTE CON ELETTRODI MODIFICATI.	52

3.1)Metodo proposto da Scholz et al.	52
3.2)Variazioni del metodo:scelta del film da depositare sul WE.	54
3.2.1)Deposizione di Film Polipirrolico.	54
3.2.2)Deposizione di Film Polifenolico.	56
4) SCOPO	58
CAPITOLO 5	59
PARTE SPERIMENTALE	59
5.1) Reagenti utilizzati.	59
5.2)Strumentazione	60
5.3)Software	61
5.4.)Elettrodi modificati con polifenolo.	61
5.5) Caratterizzazione FT-IR del film di polifenolo.	63
5.6) Degradazione del film di polifenolo	66
5.6.1) Reazione di Fenton	66
5.6.2)Fotolisi dell'H ₂ O ₂ .	66
5.6.3) Prove di bianco e interferenti	67
5.6.3.1) Generazione del radicale OH· con reazione di Fenton.	68
5.6.3.2) Generazione del radicale OH· con fotolisi dell'acqua ossigenata.	69
5.6.4) Determinazione del potere antiossidante dei composti di riferimento.	71
5.7) Determinazione del potere antiossidantie con metodi standardizzati	76
5.7.1)Saggio ABTS.	76
5.7.2) Saggio DPPH.	79
5.7.3)ORAC	81
5.7.4) Metodo di Folin-Ciocalteu	84
5.7.5)Approccio Potenzimetrico.	85
5.8) Determinazione della capacità antiossidante di un campione reale.	87
5.8.1)Descrizione del campione reale.	87

5.8.2) Descrizione del trattamento del campione.	88
5.8.3) Descrizione del tipo di prove effettuate.	88
CAPITOLO 6	89
RISULTATI E DISCUSSIONE.	89
6.1) Metodo elettrochimico.	89
6.1.1) Cinetiche di degradazione.	89
6.1.2) Rette di calibrazione con integrale.	91
6.1.3) Rette di calibrazione con potere inibente a 30 minuti.	92
6.1.4)Rette di calibrazione con Lag phase.	92
6.1.5) Confronto tra i vari metodi (lag phase, integrale e potere inibente.	93
6.1.6)Confronto tra i vari antiossidanti.	93
6.1.7)Campione reale	96
6.2)Confronto della capacità' antiossidante (AOC) con metodiche analitiche standardizzate.	98
6.2.1) Misure col saggio ABTS .	98
6.2.3) Metodo ABTS applicato all'analisi del campione reale.	103
6.3) Saggio DPPH.	106
6.3.1) Misure del saggio DPPH.	106
6.3.2) Metodo DPPH applicato all'analisi del campione reale.	108
6.4) Saggio ORAC.	111
6.4.1) Misure del saggio ORAC.	111
6.3.4) Metodo ORAC applicato all'analisi di un campione reale di un succo di frutta.	114
6.5) Metodo di Folin-Ciocalteu.	116
6.6) Approccio Potenzimetrico.	119
CAPITOLO 7	122
RISULTATI E DISCUSSIONE.	122
CONFRONTO TRA LE VARIE METODOLOGIE PER LA DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE.	122

7.1)Confronto indici TEAC tra ABTS e metodo elettrochimico.	122
7.2)Confronto indici TEAC tra DPPH e metodo elettrochimico.	123
7.3)Confronto indici TEAC tra ORAC e metodo elettrochimico.	124
7.4)Confronto indici TEAC tra metodo potenziometrico e metodo elettrochimico.	124
7.4)Confronto indici TEAC e VCEAC per il campione reale.	125
8)CONCLUSIONI.	127
8). BIBLIOGRAFIA.	129
10)RINGRAZIAMENTI	133

CAPITOLO 1

RADICALI LIBERI E ANTI-OSSIDANTI

1.1) Concetto di “radicale libero”.

Col termine “Radicale” si intende una serie di specie chimiche, altamente instabili, che, presentando uno o più elettroni spaiati, sono in grado di reagire con qualsiasi molecola che incontrano, al fine di accoppiare l’elettrone spaiato. Un possibile schema di reazioni che generano radicali può essere riportato in figura 1.1:

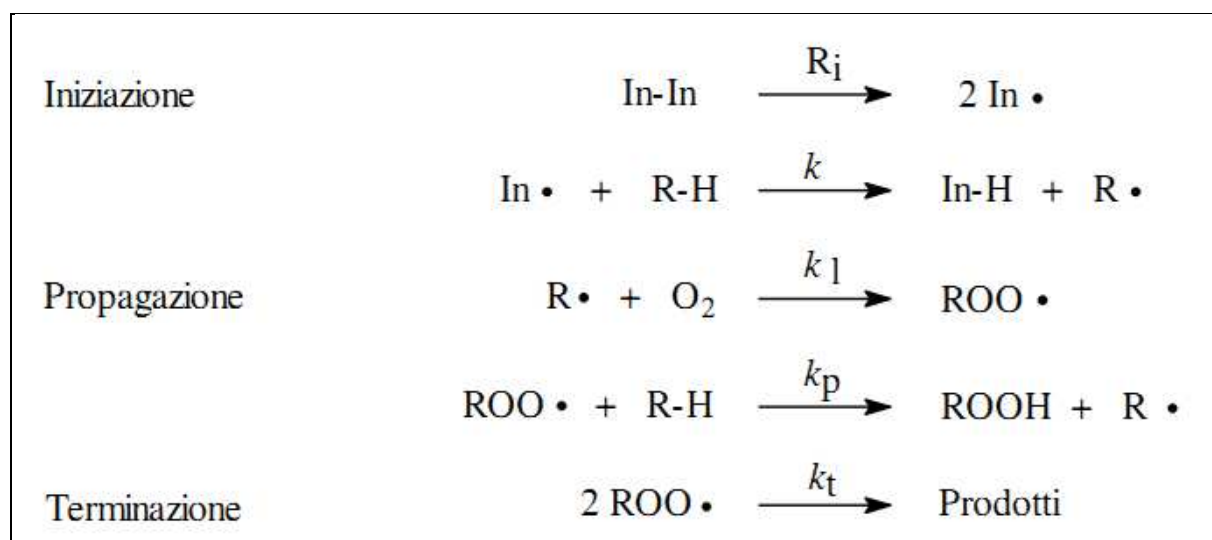


Figura 1.1: Schema di reazioni che generano radicali e che portano alla loro scomparsa.

Il processo inizia con una fase di rottura omolitica di un particolare iniziatore (In-In), che può avvenire, alla velocità R_i , per effetto termico, fotolitico o in seguito a reazione chimica (come quella di riduzione dell’ossigeno molecolare $\text{O}_{2(g)}$ a ione superossido O_2^-), in grado di generare un composto avente uno o più elettroni spaiati. L’assorbimento di radiazioni elettromagnetiche è efficace se si verifica nel range dei raggi UV e/o X. Durante la fase di propagazione, il radicale $\text{R} \cdot$, può reagire con l’ossigeno atmosferico, per dare luogo al radicale perossidico $\text{ROO} \cdot$, il quale, a sua volta porta avanti il processo di degradazione di altri composti, generando nuovamente altri radicali.

Il processo radicalico si esaurisce con lo stadio di terminazione, che avviene, in genere, per accoppiamento di radicali. Dal momento che lo stadio di propagazione radicalica può generare diverse migliaia di radicali, a partire da una molecola di iniziatore, risulta che la degradazione ossidativa del substrato, facendo riferimento a questo tipo di reazione, può essere molto efficiente.

La teoria dei radicali liberi applicata in campo medico, è stata introdotta per la prima volta da Denham Harman nel 1956, il quale sosteneva che l'azione continua di queste specie nel corpo umano fosse responsabile di fenomeni legati all'invecchiamento[1]. Infatti l'azione deleteria dei radicali si esplica soprattutto a livello biologico, dove tali composti possono causare ingenti danni a cellule e strutture macromolecolari di notevole importanza per il nostro organismo quali proteine, lipidi e DNA.

A titolo di esempio, alcune ricerche in ambito medico, avrebbero dimostrato che una elevata concentrazione del radicale ossidrilico $\text{OH}\cdot$, sia stata la causa dell'insorgenza di tumori, a seguito di una alterazione dell'informazione genetica dovuta all'ossidazione delle basi azotate[2]. L'attacco dei radicali su macrostrutture proteiche, avrebbe causato un forte calo delle attività enzimatiche, rendendo meno efficienti alcuni processi catalitici. Sui substrati lipidici, i quali rappresentano i maggiori componenti delle membrane cellulari, sono invece stati riscontrate reazioni di perossidazione del legame allilico, con conseguente degradazione delle pareti cellulari.

1.2) Specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La pericolosità delle specie radicaliche dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species), fu teorizzata da Gerschman [3], il quale sostenne, nella sua pubblicazione, il carattere deleterio dell'ossigeno nelle sue forme ridotte.

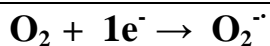
Il termine ROS comprende composti sia radicalici che non, accomunati tutti dal fatto di essere dei potenti agenti ossidanti o di essere facilmente interconvertiti in radicali [4].

Un elenco dei più comuni ROS presenti nel nostro organismo viene indicato in tabella 1.1:

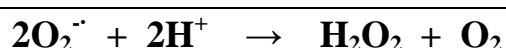
REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)	
COMPOSTI RADICALICI	COMPOSTI NON RADICALICI
<ul style="list-style-type: none"> • Superossido $\text{O}_2^{\cdot-}$ • Idrossile $\text{OH}\cdot$ • Idroperossile $\text{HO}_2\cdot$ • Alchil Perossile $\text{ROO}\cdot$ • Alcossile $\text{RO}\cdot$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Perossido di Idrogeno H_2O_2 • Acido Ipocloroso HOCl • Ozono O_3 • Ossigeno (singoletto) $^1\text{O}_{2(g)}$ • Lipidi Perossidici ROOH

Tabella 1.1 : elenco dei più frequenti ROS.

L'anione superossido $O_2^{\cdot -}$ è il precursore di tutte le specie ROS presenti nell'organismo umano[5], per cui svolge un ruolo decisivo nella generazione di altre specie radicaliche e non, quali il radicale idrossile e H_2O_2 ; deriva da un processo di riduzione monoelettronica dell'ossigeno molecolare O_2 :



L'anione superossido può comportarsi sia come agente ossidante, acquistando un elettrone per generare acqua ossigenata, sia come agente riducente, cedendo un elettrone e ritornando così ad ossigeno molecolare. Inoltre può essere coinvolto in una reazione di dismutazione [4]:

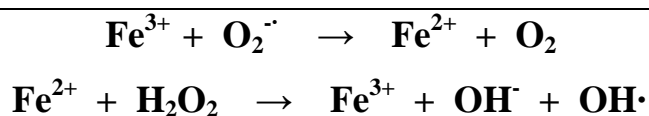


Il **radicale Idrossile** OH^{\cdot} , è la specie radicalica più aggressiva e ciò è dovuto al suo elevatissimo valore di potenziale Red/Ox standard ($E^0 = + 2,310 \text{ V vs SHE}$), che gli permette di degradare qualsiasi specie incontri nel suo percorso [6].

Tale radicale può essere generato in diversi modi nell'organismo umano. Uno di questi è rappresentato dalla reazione di Haber-Weiss, secondo cui l'anione superossido combinandosi con l'acqua ossigenata, in presenza di catalizzatori quali Fe^{3+} e Cu^{2+} , genera ossigeno molecolare, ione idrossido e radicali OH^{\cdot} [7]:

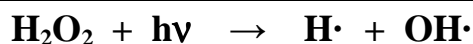


Un altro meccanismo di generazione del radicale OH^{\cdot} è la reazione di Fenton tra Fe^{2+} e acqua ossigenata. Benchè nel corpo umano il ferro sia presente completamente nello stato ossidato (III), la presenza dell'anione superossido e l'incremento di acidità dovuto alla produzione di acido lattico provocano la riduzione di Fe^{3+} a Fe^{2+} , rendendo così possibile il decorrere della reazione di Fenton.

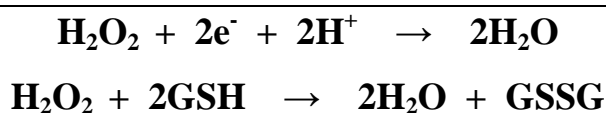


Il risultato ottenuto dalla combinazione delle 2 reazioni di cui sopra, è lo stesso di quello della Haber-Weiss[7].

Ulteriori possibili meccanismi di formazione del radicale $\text{OH}\cdot$, possono coinvolgere reazioni di fotolisi dell'acqua ossigenata, attraverso l'esposizione a radiazioni elettromagnetiche UV:



Il **perossido di Idrogeno** H_2O_2 , viene generato dalla reazione di dismutazione dell'anione superossido e viene disattivato in seguito all'azione catalitica di antiossidanti endogeni quali l'enzima catalasi e glutathione ossidasi, che riducono l'acqua ossigenata ad acqua:

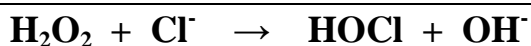


Il perossido di idrogeno è presente all'interno della cellula in concentrazioni variabili tra $10^{-7} \div 10^{-9}$ M ; la sua più grave pericolosità è data dal fatto che è in grado di attraversare le pareti cellulari, innescare meccanismi di perossidazione ed essere la base di partenza per la generazione del più dannoso radicale $\text{OH}\cdot$ [4].

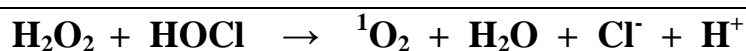
L'**ossigeno di singoletto** $^1\text{O}_2$ è una forma elettronicamente eccitata dell'ossigeno molecolare, il quale nello stato fondamentale si trova nella condizione di tripletto.

Differisce dallo stato fondamentale per il semplice fatto che presenta un'inversione dello spin di un elettrone che si trova nel guscio più esterno di valenza. Benchè non sia un vero e proprio composto di natura radicalica, si è visto che l'ossigeno di singoletto presenta diverse caratteristiche ossidanti nei confronti di substrati lipidici, come il colesterolo [8].

L' $^1\text{O}_2$ si può formare per effetto di esposizione a radiazioni UV (nel range 320÷380 nm) oppure in presenza di proteine contenenti il gruppo eme, tra cui la mieloperossidasi, che converte il perossido di idrogeno, in presenza di cloruri, in acido ipocloroso e ione idrossido:



l'acido ipocloroso a sua volta reagisce con il perossido di idrogeno per formare l'ossigeno di singoletto [4]:



Tutti i composti appena citati rientrano nel processo che prende il nome di cascata reattiva dell'ossigeno (figura 1.2), ovvero quella serie reazioni che riguardano la formazione ed il consumo delle specie ROS nel nostro organismo [5].

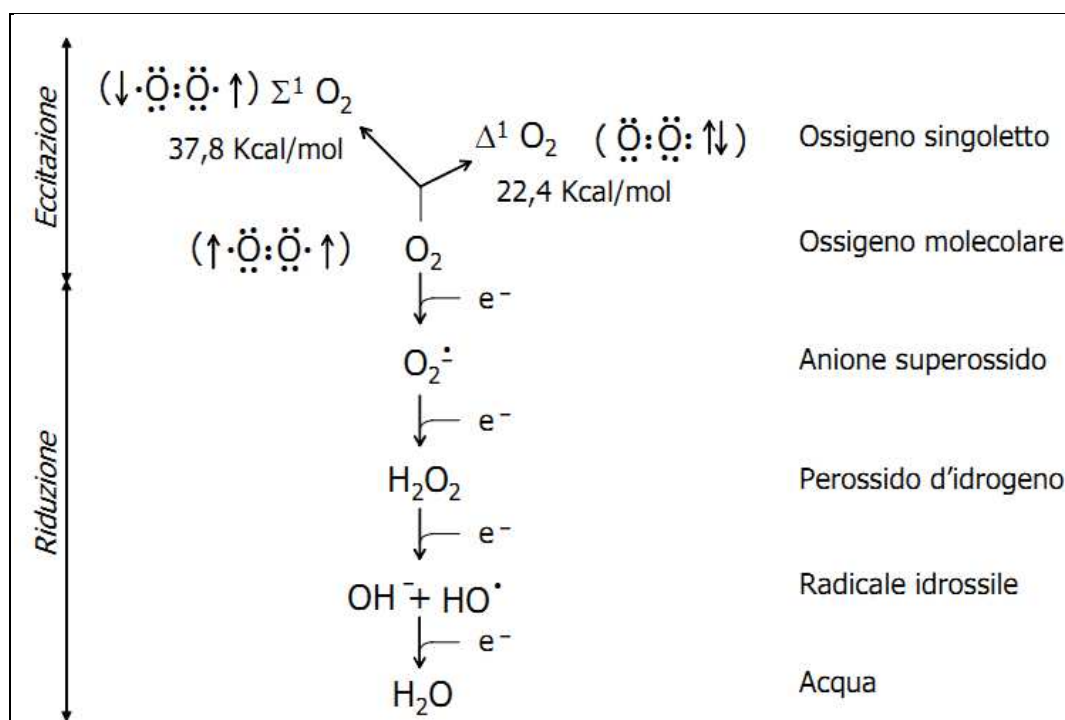


Figura 1.2. Meccanismo di formazione dei ROS nell'organismo.

La maggior parte dei ROS viene generata a livello mitocondriale, dove avvengono tutti quei processi legati alla catena respiratoria e alla ossidazione di composti organici[9].

Ne consegue che le specie ROS vengono normalmente ed inevitabilmente prodotte dal metabolismo cellulare; tali specie, che in genere sono dannose per gli organismi viventi, possono esercitare una duplice funzione, sia dannosa che benefica.

Infatti se presenti in concentrazioni molto basse, possono svolgere funzioni protettive verso composti dannosi ed estranei all'organismo e svolgere funzioni legate alla trasduzione dei segnali cellulari [10].

Qualora, invece, sia presente un surplus di specie radicaliche all'ossigeno, si cade nella condizione di stress ossidativo, in cui viene a mancare l'equilibrio tra specie radicaliche ossidanti e specie antiossidanti protettive.

In tali condizioni le specie ROS in eccesso reagiscono con i substrati biologici che incontrano, favorendo la genesi di malattie quali il cancro, il diabete, l'arteriosclerosi, il morbo di Parkinson e quello di Alzheimer [4].

Come detto nel paragrafo precedente, il DNA può essere facilmente attaccato da radicali quali la specie OH^\cdot , che ossida le basi azotate (come la timina), le quali possono poi dimerizzare.

Queste reazioni distorcono la geometria del DNA ed impediscono la trascrizione delle informazioni genetiche (figura 1.3).

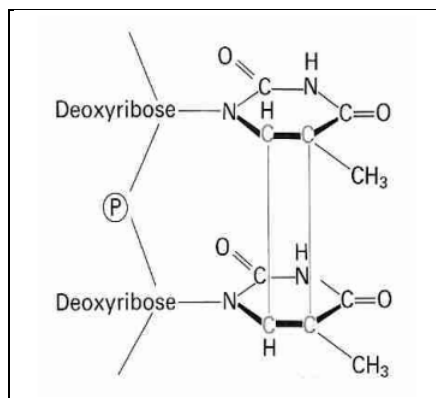


Figura 1.3.Dimeri della Timina.

Dalle ricerche condotte in questo campo, si è evidenziata la necessità di prevenire e combattere la formazione delle specie ROS, assumendo dei comportamenti appropriati come evitare di restare a prolungato contatto con radiazioni elettromagnetiche UV, di fumare, di svolgere attività fisiche troppo snervanti, ma soprattutto seguire una corretta dieta con elevato apporto di sostanze antiossidanti, in grado di equilibrare il rapporto tra la concentrazione di ROS e sostanze riducenti.

A tale riguardo, gli alimenti più indicati sono: vegetali (pomodori, zucchine, rape, broccoli, spinaci), frutta(mirtillo, kiwi, arancia, pompelmo, fragola, uva) e bevande ed estratti naturali quali vino, spremute di frutta e tè verde.

1.3) Concetto di Antiossidante.

In un atmosfera avente il 21% di ossigeno, i fenomeni di ossidazione e degradazione radicalica, non coinvolgono solo meccanismi biologici e biochimici, ma tutto ciò che ci circonda può essere sottoposto all'attacco aggressivo ed ossidante dell'ossigeno e dei suoi radicali.

La definizione di antiossidante, che più frequentemente ricorre negli articoli di letteratura, considera l'antiossidante, come una qualsiasi specie, che trovandosi in concentrazioni di gran lunga inferiori rispetto ad un dato substrato ossidabile, sia in grado di poter rallentare o inibire il processo ossidativo che porta alla degradazione di quel particolare substrato[11].

Il concetto di antiossidante non riguarda solo un contesto biologico, inquadrato nella protezione e salvaguardia di biomolecole indispensabili per i processi vitali, ma può essere esteso ed allargato a tutti quei composti e/o materiali che devono essere difesi e preservati dalla azione ossidante dell'ossigeno atmosferico.

Ad esempio, al fine di prevenire fenomeni di corrosione di acciai, è nata la necessità di utilizzare elementi di lega quali nichel o cromo, o trattamenti di rivestimento come cromatura e zincatura, in grado di preservare il pezzo nei confronti di specie chimiche fortemente ossidanti e garantire una lunga vita in esercizio.

Ad esempio lo zinco, possedendo un potenziale redox inferiore a quello del ferro, è più facilmente ossidabile dal punto di vista termodinamico, per cui garantisce al ferro di poter restare nello stato di ossidazione zero, ovvero quello metallico.

Lo stesso vale per tutti i materiali polimerici; affinché possano essere utilizzati devono essere protetti da fenomeni foto-ossidativi tramite l'impiego di composti a basso peso molecolare (che appunto svolgono una funzione antiossidante) che inibiscono o ritardano il processo di ossidazione.

L'additivazione di tali composti è indispensabile affinché il polimero mantenga inalterate le sue proprietà meccaniche, in seguito all'esposizione di agenti aggressivi quali l'ossigeno atmosferico e le radiazioni UV [12].

Alcuni esempi di antiossidanti per materiali polimerici, che hanno peraltro una forte analogia con gli antiossidanti impiegati a livello biochimico, sono i fenoli sostituiti con gruppi molto ingombranti (figure 1.4 e 1.5), le ammine aromatiche secondarie e le ammine stericamente impeditate.

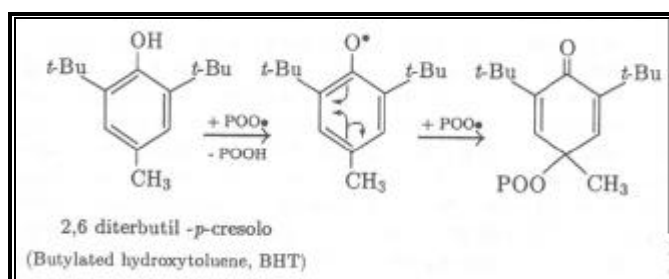


Figura 1.4 Fenoli stericamente impediti come additivi antiossidanti nei polimeri[12].

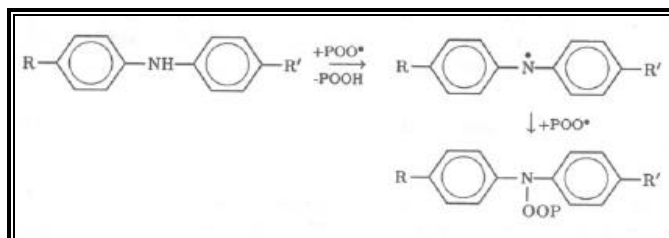


Figura 1.5 Ammine aromatiche come additivi antiossidanti nei polimeri[12].

1.4) Classificazione degli Antiossidanti

In campo biologico, può essere effettuata una classificazione dei diversi composti antiossidanti sulla base della loro provenienza e del loro meccanismo di azione nel proteggere il substrato ossidabile.

Per quel che riguarda la provenienza si effettua una prima distinzione tra antiossidanti endogeni ed antiossidanti esogeni.

Col termine antiossidante **endogeno**, ci si riferisce a tutti quei composti o enzimi presenti naturalmente nell'organismo e che hanno la funzione di bloccare la produzione di ROS.

Esempi di antiossidanti endogeni possono essere gli enzimi SOD (super ossido dismutasi), catalasi e glutazione perossidasi.

Col termine antiossidante **esogeno**, si considerano tutti quei composti assunti tramite alimentazione; gli antiossidanti esogeni vengono a loro volta suddivisi in composti vitaminici (vitamina C e vitamina E) e composti non vitaminici come le grandi famiglie dei polifenoli e carotenoidi.

Questa prima suddivisione può essere riassunta in figura 1.6:

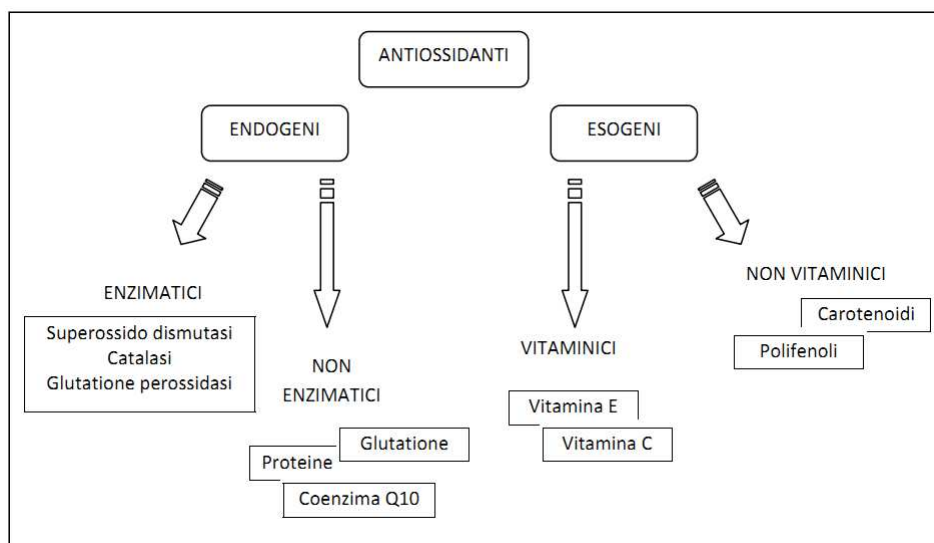


Figura 1.6: Classificazione Antiossidanti.

Per quel che riguarda il meccanismo di azione degli antiossidanti si possono considerare gli **antiossidanti primari o chain-breaking** ovvero quelle sostanze che agiscono da scavenger radicalici mediante la cessione di un atomo di idrogeno o di uno o più elettroni e gli **antiossidanti secondari o preventivi** ovvero quelli che ritardano la cinetica del processo di iniziazione radicalica [11].

Questa distinzione non è assoluta, dal momento che esistono specie chimiche che inibiscono i processi radicalici, agendo sia in qualità di ritardanti della fase di iniziazione sia da scavenger[13].

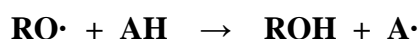
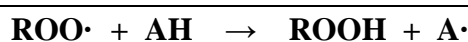
1.4.1)Antiossidanti interruttori di catena (chain-breaking).

Con la loro azione di scavenging, gli antiossidanti chain breaking sono capaci di intrappolare e bloccare l'azione dei radicali; le caratteristiche richieste sono, primariamente, quelle di reagire col composto radicalico più velocemente di quanto questo ultimo possa aggredire il substrato e, secondariamente, di generare sistemi radicalici stabilizzati per risonanza.

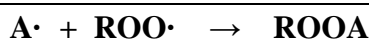
L'effetto di chain breaking può avvenire tramite 2 meccanismi:

- Meccanismo HAT(Hydrogen Atom Transfert);
- Meccanismo ET (Electron Transfert).

Per quel che riguarda il **meccanismo HAT**, considerando un generico antiossidante AH, che si trova in quantità minime rispetto al substrato, questo può ritardare o inibire l'azione di un qualsiasi radicale alcossile o alchilperossile, secondo le reazioni sotto riportate:



Il radicale libero derivante dall'antiossidante può partecipare in seguito a successive reazioni di terminazione della catena, formando dei composti di natura perossidica[11]:



L'energia di attivazione delle reazioni sopra indicate aumenta sempre più all'aumentare dell'energia di dissociazione dei legami A—H; da ciò si deduce che, l'efficienza antiossidante, per quei composti che cedono un atomo di idrogeno, aumenta al diminuire dell'energia di dissociazione del legame A—H.

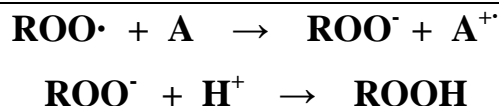
Quindi più labile è il legame A—H e più il composto assume una capacità antiossidante più efficiente ed energica nel proteggere il substrato ossidabile.

Per il meccanismo HAT, l'efficacia della capacità o potere antiossidante deriva dalla combinazione dei 2 fattori:

1. Possedere un legame A—H con bassa energia di dissociazione, per cui un atomo di idrogeno facilmente estraibile;
2. Essere in grado di generare un composto radicalico stabilizzato, che non sia più capace di far proseguire lo stadio di propagazione della catena.

Gli antiossidanti che operano secondo il **meccanismo ET**, sono molecole molto ricche di elettroni, che cedendone uno o più al composto radicalico per favorire l'interruzione della catena, si trasformano in radicali cationi stabili.

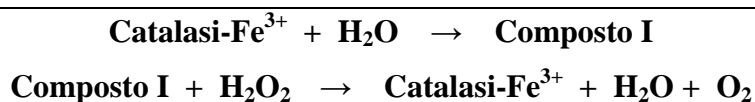
Il meccanismo può essere rappresentato come segue:



1.4.2) Antiossidanti Preventivi ed Esogeni.

Il sistema cellulare per prevenire i danni dello stress ossidativo è corredato di un sistema enzimatico efficiente, dato dalla combinazione degli enzimi superossidodismutasi, catalasi e glutathione perossidasi[4].

- L'enzima SOD (E.C. 1.15.1.6) è capace di convertire lo ione superossido in acqua ed ossigeno(figura1.1):
- L'enzima CATALASI (E.C. 1.11.1.6) è capace di convertire l'acqua ossigenata in H₂O, secondo la reazione:



L'enzima GLUTATIONE PEROSSIDASI (E.C. 1.11.1.9), viene sfruttato per il ruolo catalitico che mostra nella riduzione di perossidi lipidici, a scapito di molecole di glutathione ridotto(GSH):



Il Glutathione (GSH) è utilizzato in questo caso come antiossidante preventivo, poichè interagisce con l'enzima Glutathione Perossidasi, impedendo la degradazione di composti perossidici, come H₂O₂ e ROOH, i quali possono essere fonte di radicali.

É uno dei pochissimi antiossidanti endogeni, che agisce nella modalità di chain-breaking, grazie alla sua struttura tripeptidica, costituita da un gruppo glutammato, uno cisteinico e glicinico (figura1.7).

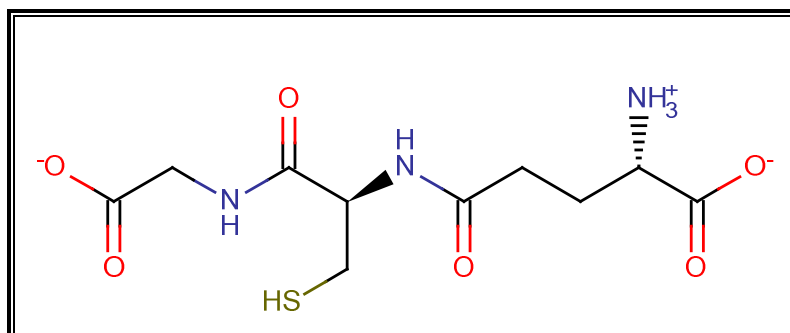
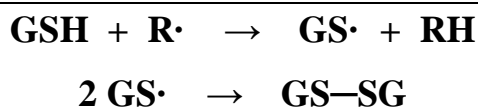


Figura 1.7: Molecola del Glutatione (GSH) a pH fisiologico 7,4.

Tale molecola grazie al residuo cisteinico presente nel centro, possiede un elevato potere riducente, che gli permette di poter intervenire in molti equilibri di ossido/riduzione al fine di proteggere diversi substrati biologici.

L'atomo di idrogeno che viene ceduto è quello del gruppo tiolico del residuo cisteinico, formando così un radicale allo zolfo abbastanza stabile, che poi dimerizza per bloccare la propagazione radicalica (meccanismo HAT).

Il meccanismo HAT che conferisce al GSH proprietà antiossidanti di chain-breaking può essere rappresentato dalla seguente reazione:



1.5) Antiossidanti Esogeni

Gli antiossidanti esogeni sono tutti quei composti che provengono dalla dieta alimentare, impiegati per combattere lo stress ossidativo; vengono suddivisi in 2 grandi categorie: Vitaminici e non Vitaminici.

1.5.1) Antiossidanti Vitaminici.

In questa categoria di antiossidanti, si annoverano la Vitamina C o (L)-Acido Ascorbico utilizzato in ambiente idrofilico e la Vitamina E o α -Tocoferolo, attivo in ambiente lipofilico per la sua elevata catena alchilica laterale.

La **vitamina C**, nella sola forma enantiomerica L (configurazione assoluta S), al valore del pH fisiologico, ovvero pH=7.4, si trova sotto forma anionica come ione ascorbato; la sua elevata capacità di bloccare e inibire l'azione di radicali, è dovuta alla stabilizzazione per risonanza dello ione ascorbile, come mostrato in figura 1.8:

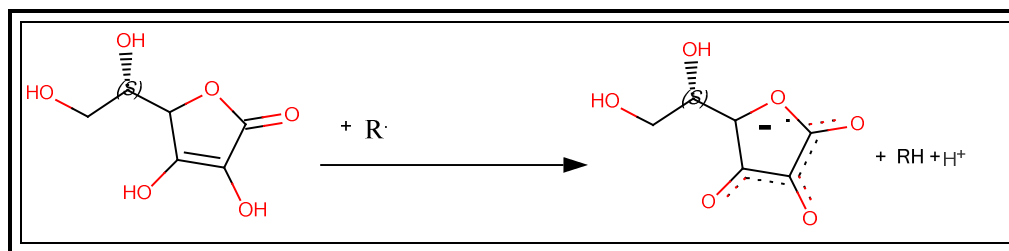


Figura 1.8 Azione antiossidante dell'acido ascorbico.

Inoltre lo ione ascorbato è in grado di ridurre gli ioni Fe^{3+} e Cu^{2+} , i quali svolgono un ruolo non irrilevante in reazioni di idrossilazione a cui può partecipare l'ossigeno molecolare[9].

Un'altra caratteristica che rende la vitamina C un efficiente antiossidante esogeno, è la capacità di rigenerare la vitamina E, dopo che questa è stata attaccata da specie radicaliche. Infatti all'interfaccia fase lipidica/acqua, si ha una forte interazione tra acido ascorbico e α -Tocoferolo, che permette alla vitamina C di acquistare l'elettrone presente sull' α -Tocoferolo, convertendosi in radicale ascorbico e rigenerando così la Vitamina E[14].

Quest' intervento dell' Acido Ascorbico permette di potenziare notevolmente la capacità antiossidante dello stesso α -Tocoferolo. La sinergia tra vitamina C e vitamina E, è rappresentata in figura 1.9, in cui si evidenzia che il radicale tocoferile reagendo con l'Acido Ascorbico, ritorna a tocoferolo :

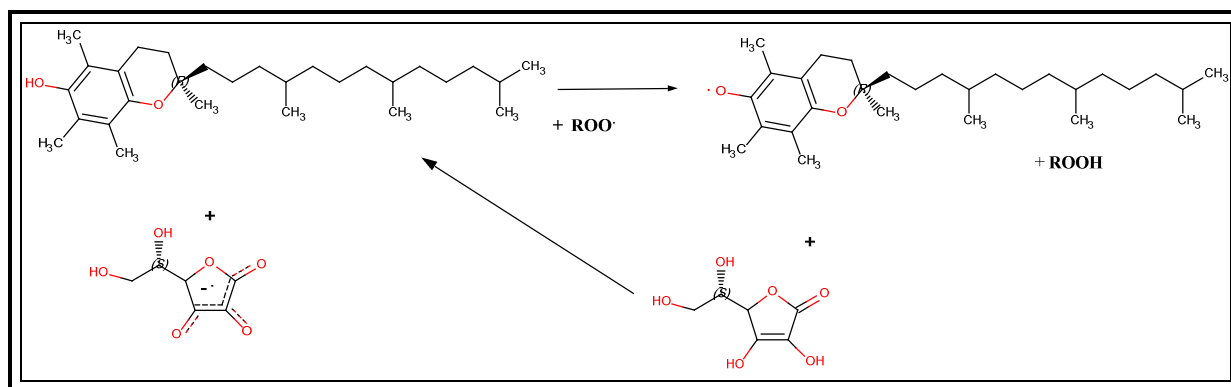


figura 1.9 Sinergia tra vitamina C e vitamina E.

La **Vitamina E** fa parte di una serie di 8 composti che rientrano nella categoria dei tocoferoli e tocotrienoli; in particolare si fa distinzione tra α -, β -, γ -, δ - tocoferoli (figura 1.10) e α -, β -, γ -, δ - tocotrienoli (figura 1.11). Tutti e 8 sono accomunati dal fatto di possedere nella struttura molecolare il sistema 6-idrossi-cromano-isoprenoide-sostituito.

La differenza riguarda invece il numero di metili collocati lungo la catena dell'anello del cromano[15].

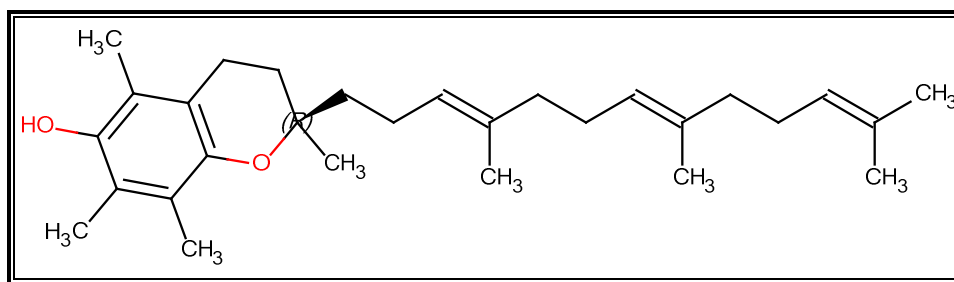


Figura1.10 Struttura dell'alfa tocoferolo

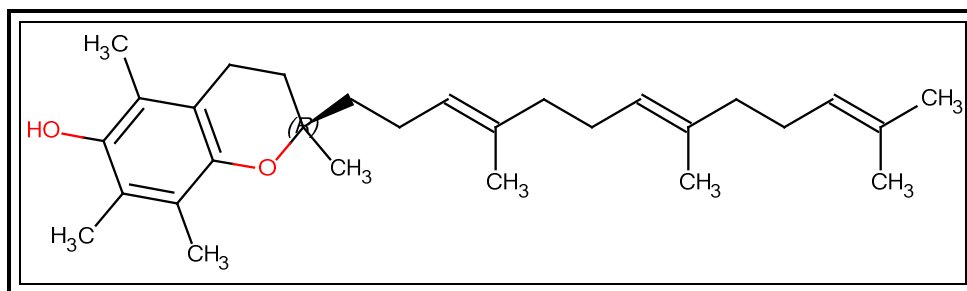


Figura1.11 Struttura dell'alfa tocotrienolo

La vitamina E, è un composto altamente liposolubile, con valori di K_{ow} intorno a 10,51, per cui ha una grande tendenza a ripartirsi nelle fasi lipidiche e nelle membrane cellulari [4].

La vitamina E agisce come un antiossidante chain-breaking, cedendo l'atomo di idrogeno del gruppo idrossilico, per generare un radicale α -cromanossilico ($TH\cdot$) avente struttura semichinonica. Il radicale $TH\cdot$ risulta essere stabile per effetto della delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello del cromo che è quasi completamente sostituito (figura 1.12). La presenza dell'Acido Ascorbico, permette di convertire il radicale α -cromanossilico($TH\cdot$) in α -Tocoferolo, nuovamente disponibile per un'ulteriore fase di scavenging o rimozione radicalica.

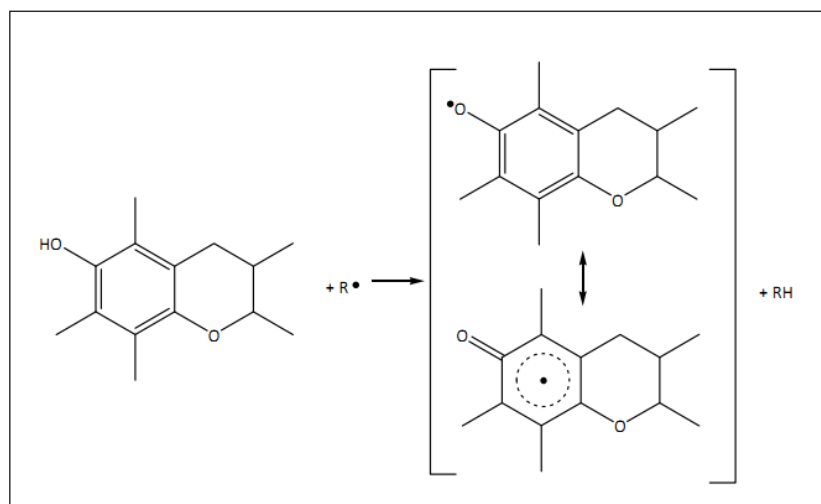


Figura 1.12 stabilità per risonanza del radicale α - cromanossilico($TH\cdot$)

E' possibile inoltre che la fase di inibizione della propagazione radicalica, possa arrivare ad una struttura chinonica (TH2) mediante reazione con $\text{OH}\cdot$; tale struttura chinonica può essere però facilmente essere convertita nell' α -Tocoferolo mediante un semplice passaggio di captazione di 2 atomi di idrogeno.

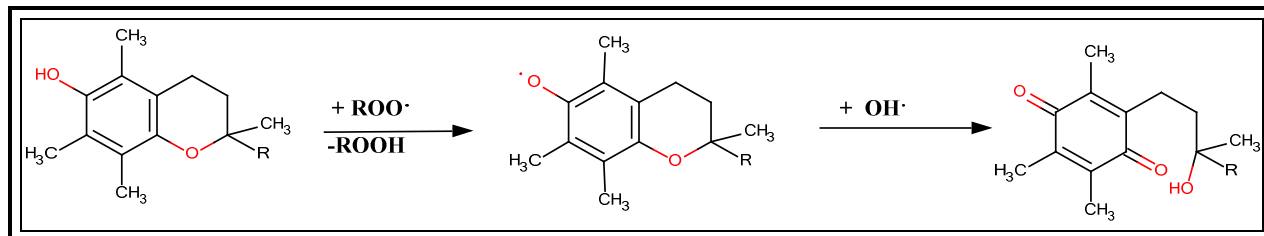


Figura 1.13 Meccanismo di degradazione dell' α -tocoferolo.

1.5.2)Antiossidanti non vitaminici.

Nella categoria di antiossidanti esogeni non vitaminici, si annoverano 2 importanti sottocategorie di composti: i polifenoli e i carotenoidi.

1.5.2.1)Polifenoli.

Col nome polifenoli si intende una serie di scavenger radicalici, accumulati tutti dal fatto di possedere più anelli aromatici e più funzionalità ossidriliche, sono ampiamente presenti in natura e suddivisi, sulla base della loro struttura molecolare, in 2 grandi insiemi: Flavonoidi e Acidi Fenolici[9].

1.5.2.2 I Flavonoidi

La struttura molecolare che serve ad identificare i composti flavonoidi è quella del 2-fenilcromano, su cui si dispongono funzionalità ossidriliche e/o semichinoniche (figura 1.14).

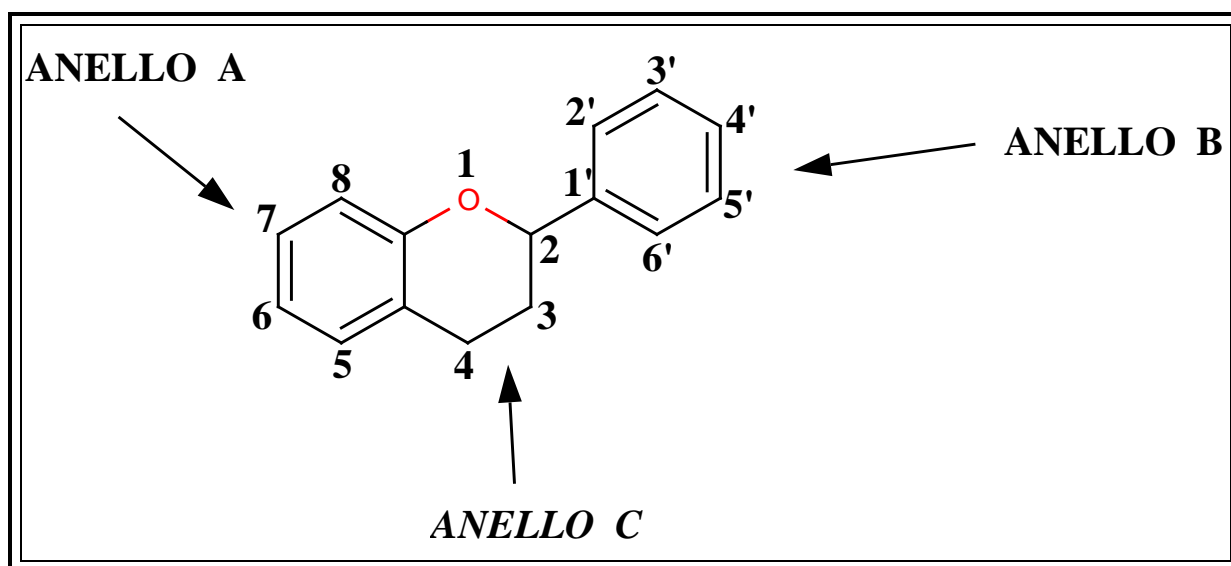


Figura1.14 Scheletro strutturale dei Flavonoidi.

La capacità antiossidante di questi composti nell'inibire le specie radicaliche, dipende fortemente dal numero e dalla disposizione delle funzionalità ossidriliche presenti sull'anello B. Infatti tali composti agiscono da antiossidanti chain-breaker, cedendo l'idrogeno del gruppo ossidrilico al radicale che incontrano; l'elettrone spaiato che così si genera viene delocalizzato nelle varie posizioni dell'anello.

Un possibile schema di reazione, legato all'attività di chain breaking dei flavonoidi, è schematizzato in figura 1.15:

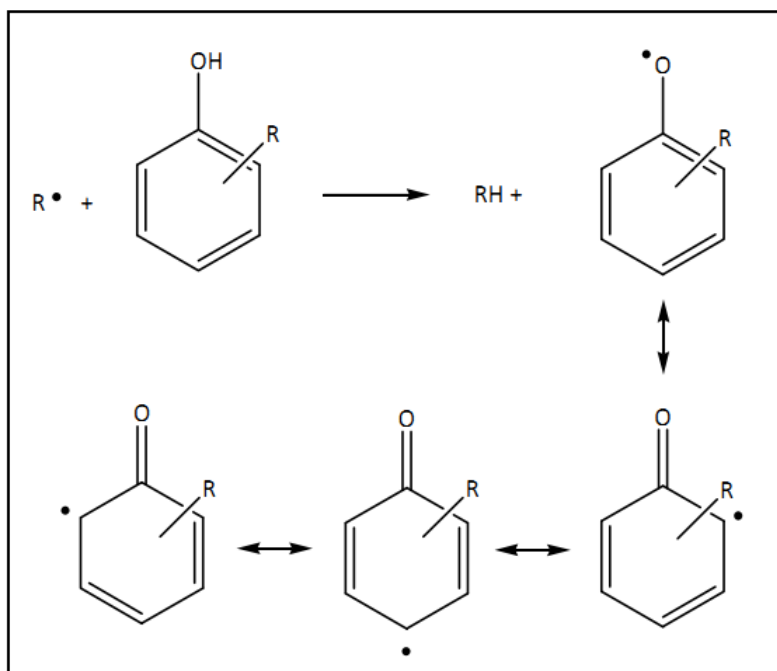


Figura 1.15. Meccanismo chain breaking dei flavonoidi.

Inoltre, la possibile presenza nella posizione 4 dell'anello B, di un gruppo carbonilico C=O α - β insaturo, conferisce al flavonoide elevate capacità complessanti nei confronti di ioni di metalli di transizione (Fe^{3+} e Cu^{2+}), in grado di catalizzare reazioni ossidative.

I Flavonoidi vengono classificati nelle seguenti 6 sottocategorie:

- **FLAVONOLI**: sono caratterizzati dalla presenza del gruppo carbonilico α - β insaturo in posizione 4 dell'anello B. La struttura generica dei flavonoli è riportata in figura 1.16:

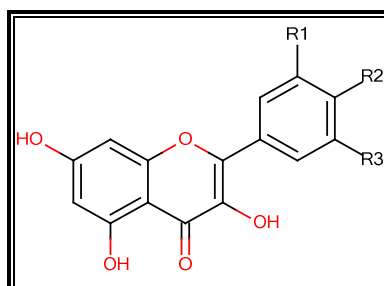


Figura 1.16. Struttura molecolare dei Flavonoli.

Tra i flavonoli, una delle molecole più frequenti in natura è la quercetina, presente nel thè, cipolla ed uva, in cui R1 e R2 sono sostituiti dal gruppo ossidrilico —OH e il gruppo R3 da un atomo di idrogeno.

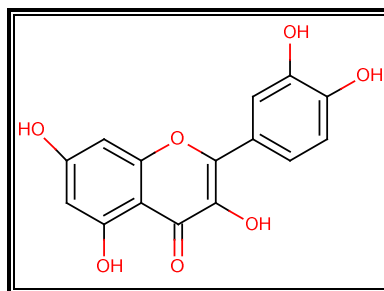


Figura 1.17. Struttura molecolare della Quercetina.

- **FLAVANOLI:** si differenziano per l'assenza della funzionalità carbonilica in posizione 4 e per la mancanza di doppi legami nell'anello C.

La struttura generica dei flavanoli è la seguente (figura 1.18):

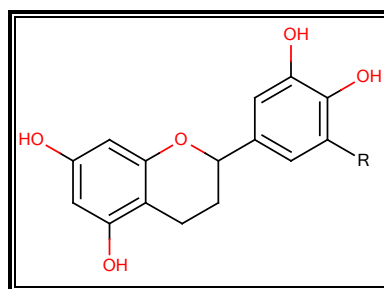


Figura 1.18. Struttura molecolare della classe dei flavanoli.

Sostituendo al gruppo R un atomo di idrogeno si ottiene la Catechina, mentre sostituendolo con un gruppo ossidrilico si ottiene l'Epigallocatechina, flavonoidi molto presenti in diversi prodotti naturali quali mele, thè, vino e cacao. Tra i flavanoli spicca anche la (-)-Epicatechina((2R,3R)-2-(3,4-diidrossifenil)-3,4-diidro-2H-1-benzopiran-3,5,7-triolo) (figura 1.19), presente anche essa in diverse tipologie di thè e di vini, di cui si parlerà più diffusamente nella parte sperimentale.

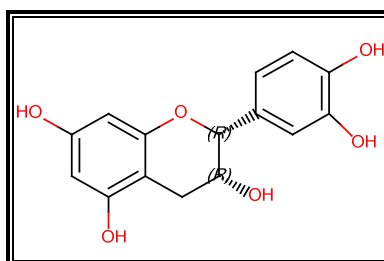


Figura 1.19. Struttura della (-)-Epicatechina.

- **ANTOCIANIDINE:** si distinguono per la presenza di un nucleo piranico completamente insaturo (l'anello C assume carattere aromatico), sul cui atomo di ossigeno è collocata una carica positiva.

La struttura generica delle Antocianidine viene rappresentata come segue in figura 1.20:

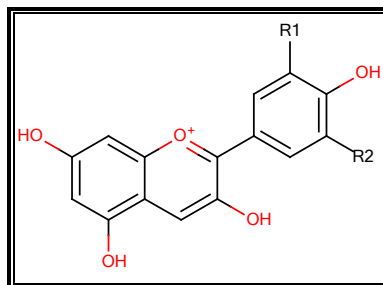


Figura 1.20. Struttura molecolare delle Antocianidine.

- **ISOFLAVONI:** hanno come caratteristica peculiare il fatto di avere l'anello aromatico B legato in posizione 3, a differenza di tutti gli altri Flavonoidi in cui il legame interessa la posizione 2. Presentano inoltre una funzionalità carbonilica in posizione 4 dell'anello C. La struttura generica degli Isoflavoni è la seguente, mostrata in figura 1.21:

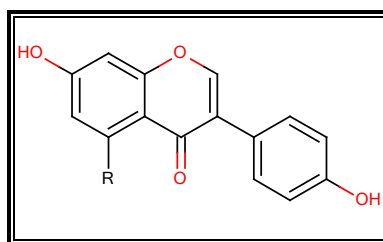


Figura 1.21. Struttura molecolare degli Isoflavoni.

- **FLAVANONI:** sono caratterizzati dal gruppo carbonilico in posizione 4 e dall'assenza di insaturazioni nell'anello C.

La struttura base per i Flavanoni è indicata in figura 1.22:

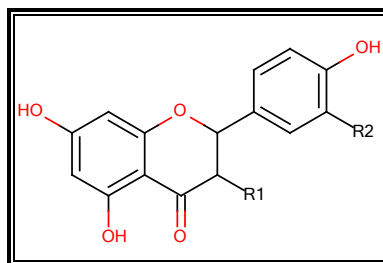


Figura 1.22. Struttura molecolare dei Flavanoni.

- **FLAVONI:** presentano una struttura molecolare molto simile a quella dei Flavanoni, con la sola differenza che non possiedono la funzionalità ossidrilica nella posizione 3 dell'anello C (figura 1.23).

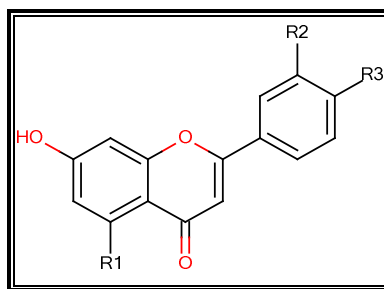


Figura 1.23 Struttura molecolare dei Flavoni.

1.5.2.3)Acidi Fenolici.

L'altra grande famiglia dei polifenoli, è data dagli acidi fenolici, suddivisibili a loro volta in derivati dell'acido idrossibenzoico e derivati dell'acido cinnamico.

Il più importante derivato dell'acido idrossibenzoico, è l'**acido gallico** o **acido 3,4,5-triidrossibenzoico** (figura 1.24), comunemente presente nelle piante e nel vino e derivante da strutture più complesse quali i tannini idrolizzabili [9].

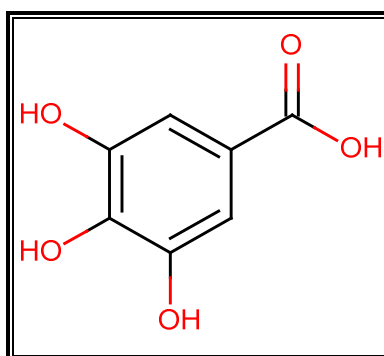


Figura1.24.Struttura molecolare dell'acido gallico.

Tra i derivati più importanti dell'acido cinnamico si annovera l'acido caffeico (figura1.25), contenuto in cereali, kiwi e caffè.

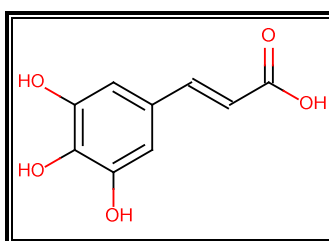


Figura1.25. Struttura molecolare dell'acido caffeico.

In generale per tutti i polifenoli, la capacità antiossidante dipende dalla facilità con cui il composto è in grado di donare il radicale $H\cdot$.

Attraverso la teoria BDE (Bond Dissociation Enthalpy) si è stabilita una sorta di classificazione tra le varie sostanze polifenoliche, basata sulla capacità e facilità di rottura del legame O—H [9].

I parametri su cui è stata costruita tale teoria sono i seguenti:

- Tipologia e quantità di sostituenti sull anello aromatico: la presenza di gruppi Elettron Attrattori, tende ad indebolire l'energia di dissociazione del legame O—H, aumentando la capacità antiossidante del polifenolo.
- Posizione del legame O—H: il gruppo ossidrilico deve essere facilmente attaccabile dalla specie radicalica, per cui non deve subire l'ingombro sterico di gruppi laterali.
- Stabilità del radicale formato dalla reazione con l'antiossidante: l'elettrone spaiato presente sul polifenolo deve essere delocalizzato. Anche in questo caso è estremamente importante la tipologia dei sostituenti nell'anello; infatti la presenza di sostituenti elettron attrattore, aumenta il grado di delocalizzazione e rendendoo più efficace l'attività antiossidante.

Sulla base di questo modello è possibile prevedere il comportamento dei vari polifenoli nello spegnere i processi radicalici e ipotizzare linee guida per la sintesi di efficaci antiossidanti. A titolo di esempio, vengono riportati alcuni valori di BDE, relativi a fenoli variamente sostituiti[16]:

R ₁	R ₂	R ₃	BDE (kcal/mol)
H	H	H	88.3
H	H	Me	86.2
H	H	CMe ₃	85.3
H	H	OMe	82.8
Me	H	H	84.5
CMe ₃	H	H	82.8
OMe	H	H	83.2
H	CMe ₃	H	86.6
H	OMe	H	86.7
Me	H	Me	82.7
CMe ₃	H	CMe ₃	81.2 (rif.)
OMe	H	OMe	80.0
CMe ₃	H	Me	81.0
CMe ₃	H	OMe	78.3
Me	H, Me	OMe	79.2
Me	Me	OMe	81.9
CMe ₃	H	NO ₂	84.9
CMe ₃	H	COOH	84.3
CMe ₃	H	COOMe	84.1
CMe ₃	H	CHO	84.2
CMe ₃	H	CN	84.2
CMe ₃	H	Cl	82.4
CMe ₃	H	Ph	81.2
CMe ₃	H	RS	81.0
CMe ₃	H	CH=CHCOOH	80.8 ^a
CMe ₃	H	PhCH=CH	78.9
α-TOH			78.2

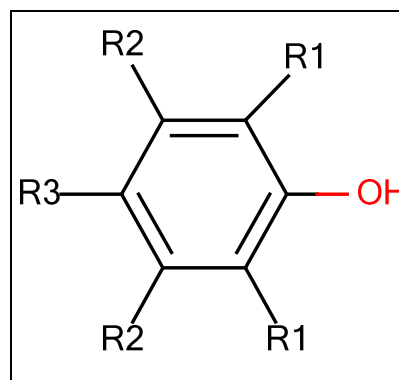


Tabella 1.2 e figura 1.26 Valori calcolati della BDE per diversi sostituenti R sull'anello fenolico[16].

Come si nota dalla tabella 1.2 e dalla figura 1.26, la presenza di gruppi elettron donatori in posizione orto e para, sull'anello aromatico di un fenolo sostituito, permette di abbassare il valore della DBE, e quindi di indebolire il legame, aumentando così la capacità antiossidante del composto, in quanto sarà sempre più spinto a cedere un atomo di H per lo spegnimento di processi radicalici.

CAPITOLO 2

METODICHE ANALITICHE STANDARD PER LA DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE (AOC).

In seguito a diversi studi, tesi ad evidenziare l'importanza del ruolo biologico, e non, dei composti antiossidanti, per quel che concerne lo stress ossidativo e le sue drastiche conseguenze (arterosclerosi, diabete mellitico, infiammazioni croniche, disordini neurogenerativi e diverse tipologie di cancro), sta diventando sempre più di interesse scientifico, la necessità di poter quantificare in modo standardizzato la capacità antiossidante di diversi composti e sostanze[17].

Negli ultimi anni si è verificato un notevole aumento di pubblicazioni, riguardanti gli antiossidanti e lo stress ossidativo: nel 1993 le pubblicazioni su tale argomento ammontavano a 1684, nel 2003 a 6510, con un aumento di circa il 340%[18].

Tale argomento nella sua complessità spazia tra discipline tutte correlate strettamente tra loro: dalla medicina alla scienza agrolimentare (food science), fino alla biologia e chimica analitica.

Il ruolo della chimica analitica è stato infatti quello di mettere a punto metodiche standardizzate, in grado di valutare e misurare la capacità antiossidante (AOC) di campioni reali come quelli alimentari (quali frutta, cibo, bevande ed estratti naturali) e quelli clinico-biologici quali plasma sanguigno, urine e siero.

I ricercatori hanno adottato diversi termini per indicare la capacità antiossidante di un campione; i termini più impiegati, a volte anche in modo improprio, sono i seguenti: efficacia, azione, potere, parametro, potenza, potenziale ed attività[19].

Molto spesso si pone l'attenzione sul diverso significato che sussiste tra il concetto di capacità ed attività antiossidante, benchè in molti articoli questi 2 termini vengano erroneamente utilizzati come sinonimi.

Col termine **capacità antiossidante AOC**, si considera la misura delle moli di un dato radicale libero che vengono inibite e/o rimosse da una data soluzione, indipendentemente dalla attività antiossidante di ogni singolo composto presente nella soluzione. La misura dell'AOC è quindi una misura di bulk della soluzione, tiene cioè in considerazione la somma di tutti i contributi dei vari antiossidanti presenti nel campione e dei possibili effetti sinergici.

Col termine **attività antiossidante AOA**, si intende la costante cinetica di un singolo composto antiossidante nei confronti di un preciso radicale libero; ci si riferisce cioè alla capacità di una particolare molecola antiossidante, di bloccare e contrastare i vari meccanismi radicalici[20]. L'importanza dell'attività antiossidante, è quella di potere stilare una vera e propria classifica tra i vari composti puri.

La necessità di poter confrontare diversi prodotti commerciali e agrolimentari e di controllare lo stato di salute di pazienti, ha permesso l'ottimizzazione e la messa a punto di metodiche standard per la valutazione dell'AOC.

Una metodica standard per la determinazione dell'AOC, dovrebbe presentare e rispettare i seguenti requisiti[11]:

- Riguardare misurazioni chimiche applicabili a campioni reali.
- Impiegare reazioni che avvengono preferenzialmente nei sistemi viventi per la generazione di specie radicaliche.
- Essere semplice, rapido e facilmente applicabile per analisi routinarie e di controllo qualità.
- Richiedere l'utilizzo di una strumentazione analitica facilmente reperibile, poco costosa e di facile impiego.
- Avvenire secondo un preciso meccanismo chimico di reazione .
- Essere altamente riproducibile e robusto.
- Essere adattabile preferenzialmente per antiossidanti idrofilici e lipofilici .

Ovviamente le prestazioni di una metodica analitica dovranno essere sempre valutate in termini di intervallo lineare di lavoro (analytical range), sensibilità (sensitivity), accuratezza (accuracy), riproducibilità (reproducibility) e robustezza (robustness). Purtroppo, però la complessità e la vastità dell'argomento, hanno reso molto ardua la possibilità di utilizzare un metodo assoluto per valutare il valore dell'AOC; i metodi proposti, infatti, portano a risultati molto diversi, per cui si può parlare solo di metodi relativi[19].

Ogni metodo solitamente presenta le seguenti caratteristiche: un substrato, ovvero una molecola con particolari caratteristiche chimico-fisiche, che deve subire l'attacco di specie radicaliche, un agente ossidante o iniziatore di radicali, una molecola antiossidante o un campione di cui si vuole testare l'AOC e un sistema strumentale in grado di monitorare nel tempo una proprietà della soluzione che viene fatta variare con lo sviluppo e produzione di radicali (es: assorbanza, intensità di emissione fluorescente, conducibilità ecc..). A rendere

più difficile il confronto tra i vari metodi, le modalità con cui viene espresso il valore dell'AOC sono molteplici; in tabella 2.1 ne vengono riportati alcuni tra i più usati:

MODALITA'DI ESPRIMERE L'AOC	RISULTATO
Tempo di induzione o "lag phase"	(minuti), (secondi)
Tempo richiesto per arrivare ad uno specifico livello di ossidazione/degradazione	(minuti), (secondi)
Velocità di ossidazione/degradazione	(mol/(litri*secondi))
Concentrazione necessaria per produrre un effetto antiossidante equivalente a quello di una molecola standard	(mequivalenti), (mol/l)
Concentrazione di gruppi funzionali in seguito ad un periodo di tempo fisso	(mequivalenti), (mol/l)
Concentrazione di prodotto ossidante in seguito ad un periodo di tempo fisso	(mequivalenti), (mol/l)
Variazione di una particolare proprietà della soluzione dopo un tempo fisso	Assorbanza, Conducibilità, Emissione Fluorescente, Differenza di Potenziale ecc...

Tabella 2.1 Parametri con cui esprimere il valore dell'AOC[11].

Data l'impossibilità di avere un metodo assoluto per la valutazione dell'AOC, si è sentita l'esigenza di dover stilare una serie di metodiche analitiche standardizzate per applicazioni routinarie sia a livello aziendale/industriale, che a livello di ricerca. Nel giugno del 2004, ad Orlando, in Florida, si è tenuto il 1° Congresso Internazionale sui Metodi Analitici per la valutazione dell'AOC.

Un possibile elenco di metodi standardizzati e non, viene indicata in tabella 2.2:

Classification		
Principle	Marker	Method
Oxidative stress	Lipid oxidation	<i>Oxygen absorption</i> : Manometric, polarographic
		<i>Diene conjugation</i> : HPLC, spectrophotometry (234 nm)
		<i>Lipid hydroperoxides</i> : HPLC, GC-MS, chemiluminescence, spectrophotometry
		<i>Iodine liberation</i> : Titration
		<i>Thiocyanate</i> : Spectrophotometry (500 nm)
		<i>Hydrocarbons</i> : GC
		<i>Cytotoxic aldehydes</i> : LPO-586, HPLC, GC, GC-MS
		<i>Hexanal and related end products</i> : Sensory, physicochemical, Cu(II) induction method, GC
		<i>TBARS</i> : Spectrophotometry (532–535 nm), HPLC
		<i>Rancimat</i> : Conductivity
Scavenging radical species	Protein peroxidation	<i>F₂-iP</i> : GC/MS, HPLC/MS, immunoassays
		<i>Modified tyrosines</i> : GC/MS, HPLC, immunoassays
	DNA damage	<i>Protein carbonyls</i> : Atomic absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, HPLC
		<i>8-Hydroxydeoxyguanosine</i> : HPLC, ELISA
	Superoxide radical	Spectrophotometry (560 nm)
		Gas chromatography
	Hydrogen peroxide	Electron spin resonance spectrometry
		Photochemiluminescence
	Hydroxyl radical	Spectrophotometry (230 nm)
		Chemiluminescence
	Hypochloric acid	Briggs-Rauscher oscillation
		Spectrophotometry (532 nm)
	Singlet oxygen	Electron spin resonance spectrometry
		Spectrophotometry (410 nm)
Scavenging radical species	Peroxynitrite	Spectrophotometry (440 nm)
		Chemiluminescence
	Peroxyl radical	Spectrophotometry (275–500 nm)
		HPLC
	ABTS radical cation	ORAC: Fluorescence
		TRAP: Chemiluminescence, fluorescence
	DMPD radical cation	DCFH-DA: Fluorescence, spectrophotometry (480 nm)
		TOSC: Gas chromatography
	DPPH radical	β -Carotene bleaching: Spectrophotometry (470 nm)
		Crocin: Spectrophotometry (443 nm)
Other procedures	Folin-Ciocalteu	Spectrophotometry (660–820 nm)
		Spectrophotometry (505 nm)
	FRAP	Electron spin resonance spectrometry
		Spectrophotometry (515–528 nm)
	CUPRAC	Spectrophotometry/HPLC
	Cyclic voltammetry	Spectrophotometry (750 nm)
		Spectrophotometry (593 nm)
		Spectrophotometry (450 nm)
		Voltammetry

Tabella 2.2 Elenco di metodiche analitiche per la valutazione in vitro dell'AOC [21].

Come si deduce dalla tabella 2.2, la complessità dell'argomento deriva proprio dal fatto che ogni metodo dipende strettamente da un particolare principio con cui si intende la capacità antiossidante (misura dello stress ossidativo, misura della scavenging activity ecc..) e che ogni metodo è specifico e risponde quasi ad una sola tipologia di specie radicalica[19].

Proprio per tutti questi motivi, una valutazione completa della capacità antiossidante può essere realizzata solo dal confronto e dalla correlazione dei dati ottenuti con diverse metodiche, al fine di riscontrare possibili analogie e somiglianze[19].

Tra i vari metodi indicati in tabella 2.2, quelli che trovano una più ampia applicazione nelle analisi di tipo routinario in campo chimico-biologico e clinico sono :

- ORAC;
- FRAP;
- TRAP;
- ABTS-TEAC;
- DPPH;
- Metodo di Folin-Ciocalteu per la determinazione del contenuto totale dei polifenoli.

Il presente capitolo tratterà in modo sintetico le diverse procedure analitiche sopra-elencate.

2.1)Metodo ORAC.

Il metodo ORAC, acronimo di “Oxygen Radical Absorbance Capacity”, è uno dei metodi maggiormente impiegati e descritti in letteratura per la valutazione della capacità antiossidante, espressa come capacità di scavenging delle molecole antiossidanti nei confronti del radicale alchilperossido $ROO\cdot$.

Tale metodica è stata messa a punto nel 1993 dal medico e chimico Guohua Cao e collaboratori[22].

Il principio del test ORAC è quello di misurare il decadimento dell'intensità di fluorescenza di una molecola target, in seguito alla formazione di radicali $ROO\cdot$, ottenuti tramite la decomposizione termica di un azocomposto organico.

I radicali alchilperossidici si attaccano sulla struttura molecolare del composto fluorescente, determinando un effetto di spegnimento o “quenching” di fluorescenza, che viene monitorato nel tempo. Il metodo originario utilizzava come “molecola probe” di fluorescenza la β -ficoeritrina (figura 2.1) [22] :

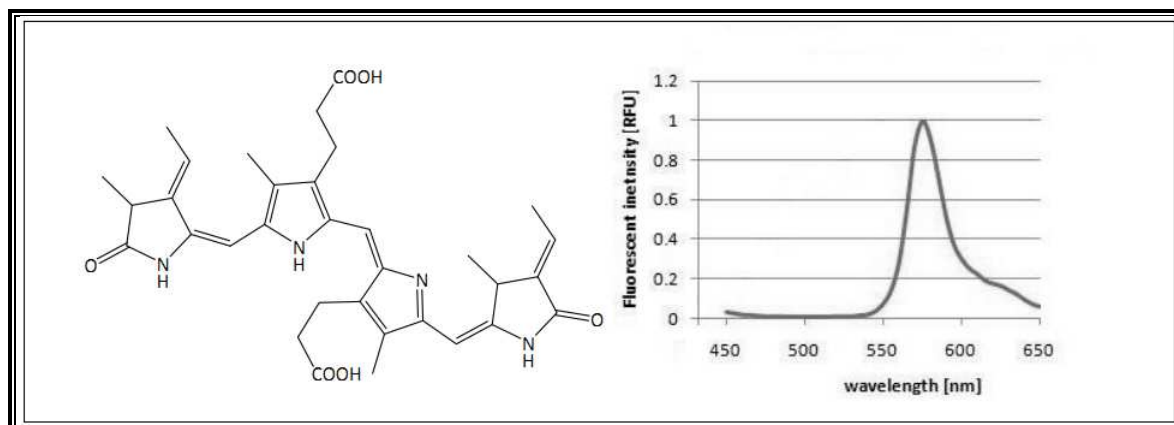


Figura2.1: struttura molecolare e spettro di emissione della β -ficoeritrina.

In seguito è stato proposto di cambiare il marker di fluorescenza utilizzando la più comune fluoresceina (Figura 2.2).

La Fluoresceina, oltre ad essere più facilmente reperibile ed economica, è estremamente vantaggiosa perchè è più stabile della β -ficoeritrina e permette di ottenere una maggiore sensibilità e selettività del metodo[23].

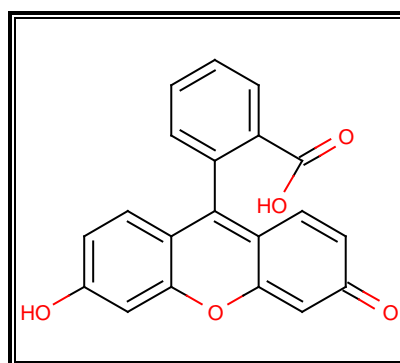


Figura 2.2 Struttura molecolare della Fluoresceina.

Le molecole antiossidanti presenti nel campione bloccano e inibiscono l'azione del radicale $\text{ROO}\cdot$; in tal modo il probe di fluorescenza mantiene costante ed inalterata la sua intensità emissiva.

Quando le molecole di antiossidante non sono più sufficienti a bloccare l'azione dei radicali alchil perossidici, questi attaccano la fluoresceina, causando un netto e repentino calo dell'intensità di emissione.

La generazione di radicali $\text{ROO}\cdot$ è ottenuta tramite la decomposizione termica a 37°C della molecola AAPH (2-2'azobis-2-aminidinopropano cloridrato); si hanno 2 rotture omolitiche dei legami C-N, con sviluppo di una molecola di azoto N_2 e 2 radicali $\text{ROO}\cdot$, come si vede in figura 2.3:

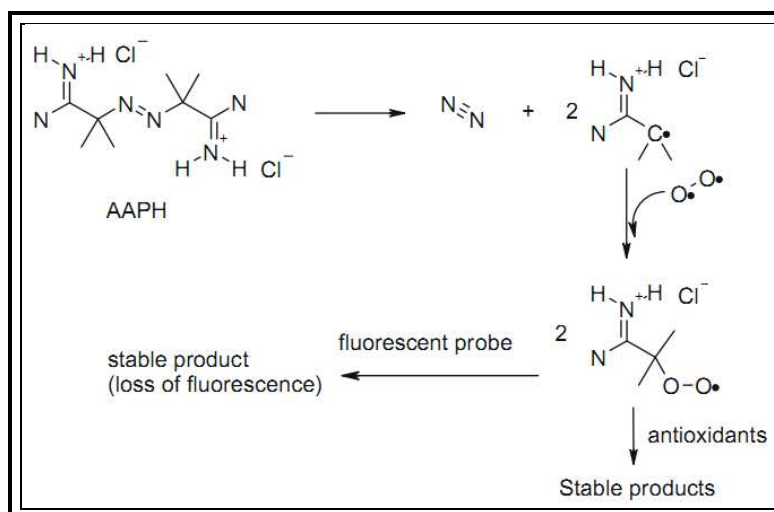
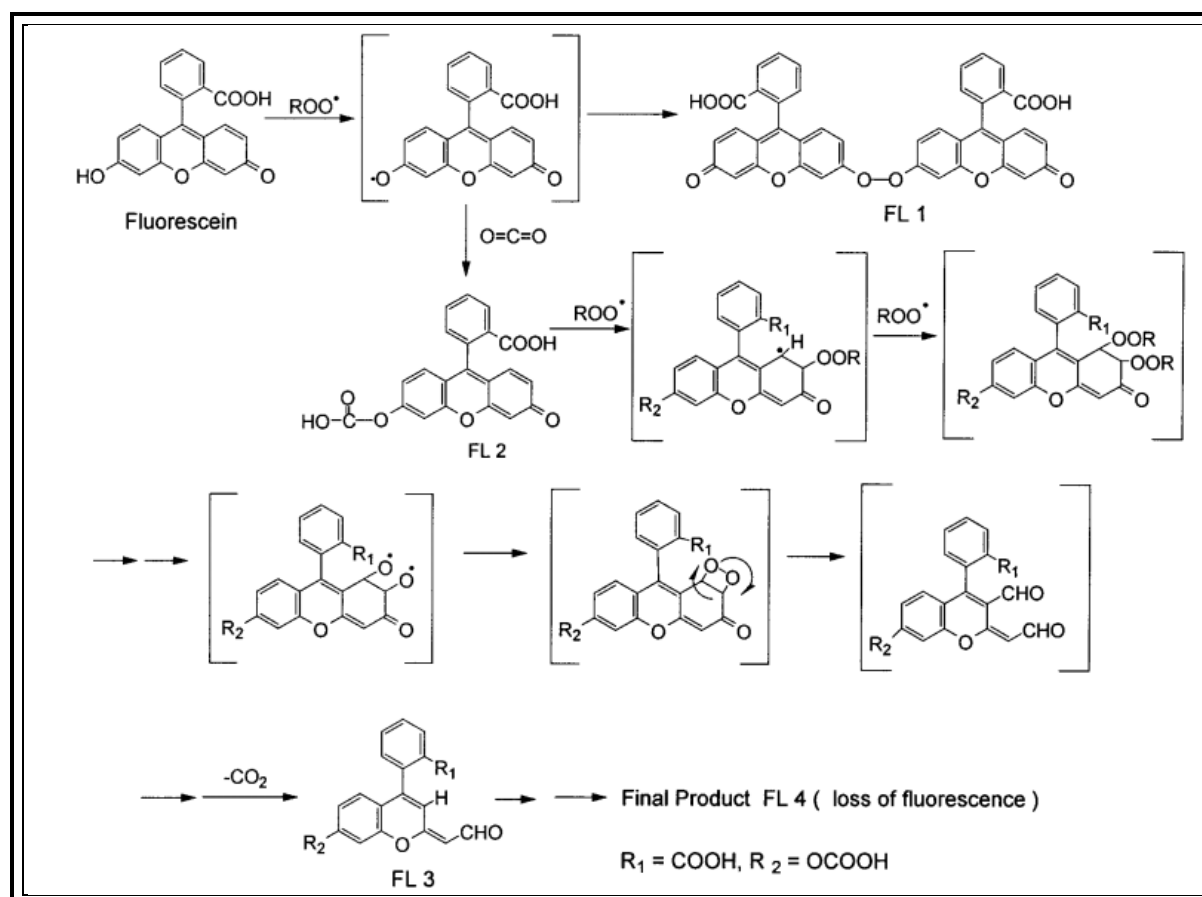


Figura 2.3 Decomposizione termica dell' AAPH a 37°C[24].

L'intero meccanismo di reazione che è stato indagato con la tecnica HPLC-MS, è stato ipotizzato come riportato in figura 2.4[23]. Dallo schema di reazione si può notare come la capacità di “radical scavenging” della molecola probe agisca secondo la tipologia HAT, ovvero l'inibizione della attività ossidante del radicale avviene tramite la cessione di un atomo di idrogeno H:

Figura 2.4. Meccanismo di reazione legato all'attacco dei radicali ROO^{\bullet} sulla Fluoresceina[23].

Come già detto, il parametro monitorato nel tempo, attraverso uno spettrofluorimetro, è la perdita di fluorescenza (“loss of fluorescence”). Ovviamente all’aumentare della concentrazione di antiossidante, aumenta il valore della “lag phase” o “lag time”, ovvero il tempo di protezione da parte dell’antiossidante, prima dell’ attacco alla fluoresceina da parte dei radicali ROO·, con conseguente diminuzione dell’intensità di luce emessa.

I valori dell’effetto protettivo dell’antiossidante verso il probe di fluorescenza, è dato dalla misura dell’area sottesa alla curva di decadimento dell’intensità emissiva, sottratta del valore del bianco; questo parametro, definito AUC(Area Under the Curve), tiene conto della lag phase, della velocità di perdita delle fluorescenza e dell’effetto dell’inibizione.

Per questa ragione, il parametro AUC, viene impiegato per la costruzione di rette di calibrazione, da cui è possibile determinare quantitativamente il valore della capacità antiossidante. Un esempio di decadimento di fluorescenza, dovuta alla generazione di radicali, viene rappresentata in figura 2.5:

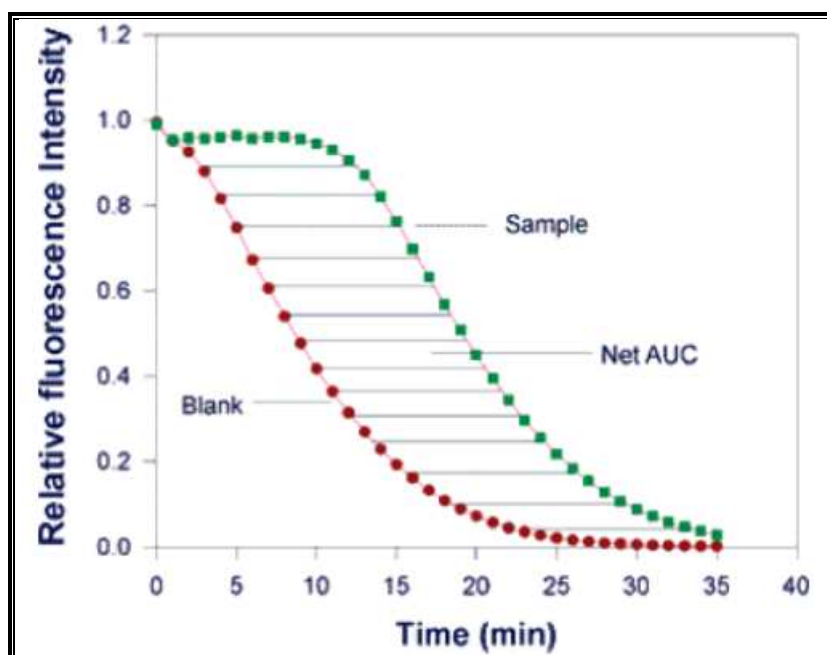


Figura 2.5: Perdita di Fluorescenza nell’analisi ORAC[19].

I valori ORAC vengono di solito riportati come Trolox[®] equivalenti (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) (figura2.6), che è una molecola sintetica impiegata come standard di riferimento nelle analisi, la quale corrisponde all’analogo idrosolubile della Vitamina E, poichè la lunga catena alchilica apolare è stata sostituita da un gruppo carbossilico fortemente polare.

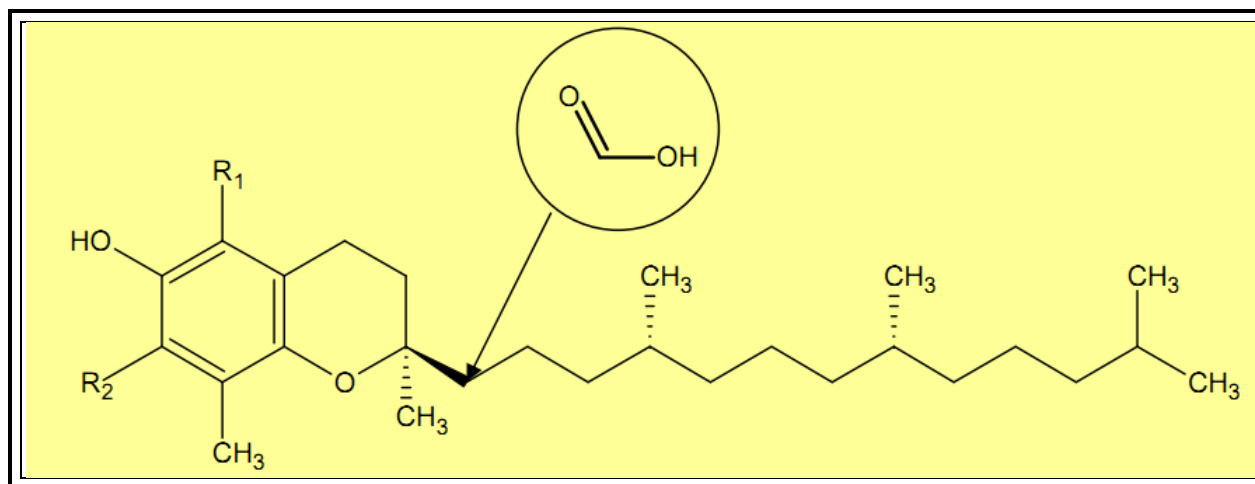


Figura 2.6. Struttura molecolare del Trolox[®], analogo idrosolubile della vitamina E (R₁, R₂=H).

I risultati per i campioni reali vengono quindi espressi come micromoli di Trolox equivalenti (TE), valutati per litro o grammo di campione (μmol di TE/g] o μmol di TE/L)). Il metodo ORAC è stato largamente applicato e adattato da diverse aziende per la quantificazione dell'AOC, al punto tale che il valore ORAC viene anche riportato sull'etichetta di diversi prodotti alimentari, biologici, farmaceutici e cosmetici.

Sulla base di tale metodo è stato stimato che ogni individuo, al fine di poter contrastare gli effetti deleteri dei ROS e le conseguenze che ne derivano, debba assumere una quantità di frutta, verdura e alimenti vari, che gli consentano di raggiungere quotidianamente un valore di unità ORAC pari a circa 5000.

Per questo motivo, medici e nutrizionisti consigliano di consumare 5 pasti al giorno di frutta e verdura; viene riportata di seguito una tabella (tabella 2.3) in cui si classificano i vari alimenti in termini di unità ORAC(1 unità ORAC = 1 μ M di Trolox® equivalente).

Alimento	Unità (ORAC)
Riso integrale (100 gr.)	24287
Timo fresco (100 gr.)	27426
Paprika (100 gr.)	21932
Succo di uva nera 1 bicchiere	5216
Mirtilli 1 tazza	3480
Cavolo verde cotto 1 tazza	2048
Spinaci cotti 1 tazza	2042
Barbabietola cotta 1 tazza	1782
More 1 tazza	1466
Prugne nere 3	1454
Cavoli di Bruxelles cotti 1 tazza	1384
Succo di pompelmo 1 bicchiere	1274
Cereali gr. 50 (media)	1171
Pompelmo rosa 1	1188
Fragole 1 tazza	1170
Succo di arancia 1 bicchiere	1142
Arancia 1	983
Susina 1	626
Patata arrosto 1	575
Avocado 1	571
Uva nera (120 grammi circa)	569
Peperone 1	569
Kiwi 1	458
Patata americana 1	433
Fagiolini cotti 1 tazza	404
Cavolfiore cotto 1 tazza	400
Uvetta nera 1 cucchiaino	396
Cipolla 1	360
Uva bianca 1 grappolo	357
Melanzana 1	326
Meia 1	301
Pesca 1	248
Banana 1	223
Pera 1	222
Melone 3 fette	197
Spinaci crudi 1 piatto	182
Albicocche 3	3172
Pomodori 1	116
Cetrioli 1	36

Tabella 2.3 Indice ORAC per vari alimenti[25]

Tale tabella insieme ad altre analoghe, trovano largo impiego nell'individuare i giusti alimenti per una dieta sana e corretta, volta a combattere i processi degenerativi che stanno alla base dell'invecchiamento cellulare.

Il metodo ORAC, benchè standardizzato, è pur sempre un metodo relativo poichè si riferisce esclusivamente all'attività antiossidante dei soli radicali $\text{ROO}\cdot$.

Nel tempo ha però tale saggio analitico ha alcune subito variazioni ed è stato adattato anche allo studio di altri radicali come il radicale idrossilico $\text{OH}\cdot$.

Tale metodica, messa sempre a punta dallo stesso Cao, indicata come $\text{ORAC}_{\text{OH}\cdot}$ (per differenziarla da $\text{ORAC}_{\text{ROO}\cdot}$) prevede la generazione in situ di radicali $\text{OH}\cdot$, mediante l'utilizzo di una reazione simile a quella della Fenton (Fenton like), tra lo ione Cu^{2+} (derivante da CuSO_4) e l' H_2O_2 [26].

Più recentemente Ou e collaboratori, hanno introdotto la variante HORAC, in cui la formazione dei radicali $\text{OH}\cdot$ che attaccano la fluoresceina, viene ottenuta tramite una reazione “Fenton like” tra un complesso, generato dalla reazione in cuvetta tra CoF_2 e acido picolinico, ed H_2O_2 [27].

2.2)Metodo FRAP.

Il saggio FRAP, acronimo di “Ferric Ion Reducing Antioxidant Power”, fu messo a punto da Benzie e Strain[28], al fine di valutare a livello clinico la capacità antiossidante del plasma sanguigno; tale metodo in seguito è stato sfruttato anche per l’analisi di campioni alimentari e botanici.

Il principio si basa sulla capacità dei vari antiossidanti di ridurre il complesso di Fe(III) 2,4,6-tripiridil-s-triazina (anche indicato come $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) a Fe(II), $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ a pH 3.6 (figura 2.7) :

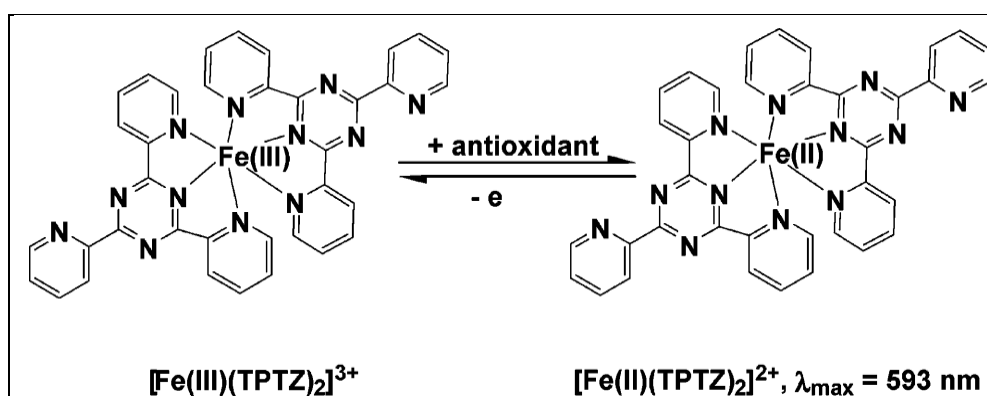


Figura 2.7. Metodo FRAP[19]

il complesso ridotto è colorato, per cui la reazione può essere monitorata spettrofotometricamente alla lunghezza di massimo assorbimento localizzata intorno a 593nm.

Tale reazione viene sfruttata per investigare prevalentemente tutti quei composti che presentano un potenziale redox più basso di 0.7 V che è il valore del potenziale redox della coppia $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}/[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$; per cui il FRAP risulta essere un test di screening teso a valutare il mantenimento dello stato redox in cellule e tessuti[19].

Una unità FRAP è arbitrariamente definita come il numero di moli di Fe(III) ridotte a Fe(II) da una mole di antiossidante testato.

Il più grande svantaggio di tale metodo è che il valore della capacità antiossidante può risultare sistematicamente maggiore se nel campione analizzato sono presenti composti che

non appartengono alla famiglia degli antiossidanti, il cui potenziale di riduzione è inferiore a quello della coppia redox Fe(III)/Fe(II) .

Un'altra grande limitazione, deriva dal fatto che tale test non è in grado di valutare la capacità di spegnimento dei radicali nella modalità HAT, per cui si possono verificare gravi sottostime nel valutare l'AOC, soprattutto nel caso di polifenoli e composti tiolici quali il glutatone.

Nonostante tutto, il test risulta essere facile, veloce, economico e robusto, al punto tale che può essere anche adattato per sistemi in "flow injection analysis"[18].

2.3)Metodo TRAP.

Il saggio TRAP, acronimo di "Total Radical-trapping Antioxidant Parameter", fu proposto per la prima volta da Wayner et al[29], al fine di misurare specificatamente il valore dell'AOC per il plasma sanguigno.

Tale metodica si fonda sulla misurazione del tempo necessario affinché il radicale $\text{ROO}\cdot$ inibisca e degradi completamente il campione di plasma sanguigno.

La generazione dei radicali perossilici $\text{ROO}\cdot$ avviene per degradazione termica del composto AAPH a 37°C , cioè nello stesso modo del saggio ORAC (figura 2.3).

Tali radicali vanno ad aggredire la β -ficoeritrina (R-PE), causando una diminuzione dell'intensità di emissione della fluorescenza.

In questo saggio si va a misurare la lag phase o lag time del campione e cioè il tempo durante il quale il campione stesso è in grado perfettamente di inibire e spegnere l'azione dei radicali perossidici mantenendo inalterato il segnale di fluorescenza, confrontato col lag time di una quantità nota di Trolox[®], usato come standard di confronto.

Infatti dal momento che non è possibile in questo caso disporre di un bianco, ovvero di un campione di plasma esente da antiossidanti, da sottrarre al valore del campione, si utilizza il lag time del plasma e, in seguito si misura il lag time derivante dall'aggiunta di una quantità nota di Trolox[®].

In questo modo utilizzando diverse soluzioni di Trolox[®] a titolo noto, è possibile costruire una retta di calibrazione col metodo delle aggiunte standard.

Dal rapporto tra i 2 valori di lag time, ottenuti per estrapolazione, si riesce a determinare la capacità del plasma di spegnere e/o rallentare l'ossidazione da parte del radicale alchilperossido, che viene espressa come la concentrazione di radicali $\text{ROO}\cdot$ inibiti.

Un esempio di applicazione di tale metodo, relativo al lavoro di Ghiselli et al.[20], viene qui di seguito riportato in figura 2.8.

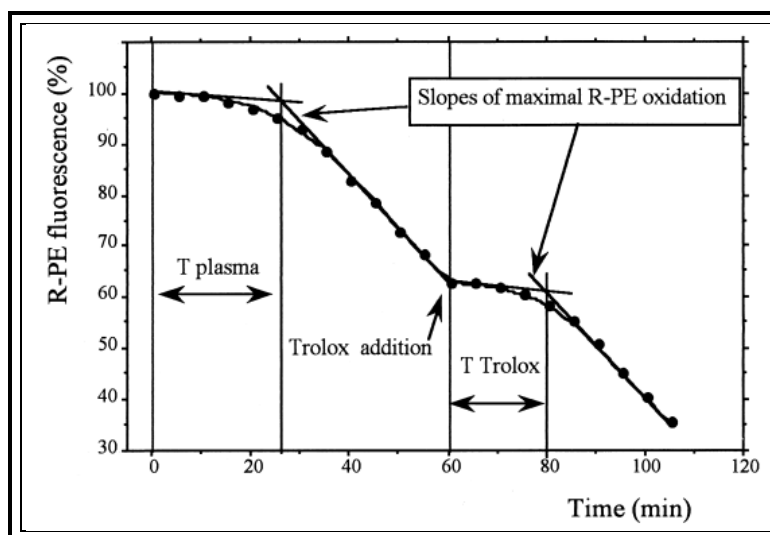


Figura 2.8. Metodo TRAP per l'analisi del plasma[20].

I due “lag time” (T_{plasma} e T_{Trolox}) vengono confrontati tra loro, e la capacità antiossidante indicata nell'equazione come X, viene calcolata come segue:

$$[\text{Trolox}^{\text{®}}] / T_{\text{Trolox}} = X / T_{\text{plasma}}$$

Per ottenere il valore del lag time del Trolox[®], il composto viene aggiunto alla miscela di reazione, quando la fluorescenza della R-PE è attorno al 50% del valore iniziale. La cinetica della reazione viene monitorata fino al punto in cui la velocità di scomparsa (pendenza della retta) della fluorescenza diventa uguale a quella registrata prima dell'aggiunta del Trolox[®].

Gli svantaggi del metodo TRAP, derivano dal fatto di essere un test più complicato di quelli citati e che necessita di molto tempo per poter essere svolto (time consuming).

Un altro difetto che viene attribuito al metodo, è quello di impiegare il lag time o tempo di inibizione, come parametro per quantificare il valore dell'AOC, dal momento che non tutti gli antiossidanti dispongono di un evidente lag time [18].

Altre critiche[30], affermano che la R-PE (e anche la Fluoresceina nel metodo ORAC), non siano in grado di simulare correttamente il comportamento di un substrato biologico.

Il saggio TRAP, nonostante tutto, trova larghissima applicazione nelle analisi chimico/cliniche in vivo, per valutare la capacità antiossidante del plasma e del siero sanguigno.

2.4) Metodo ABTS-TEAC.

Tale test spettrofotometrico, riportato per la prima volta in letteratura da Miller e Rice-Evans[53], valuta la capacità antiossidante attraverso l'abilità di rimozione radicalica da parte del catione radicalico $ABTS^{\cdot+}$ (acronimo di acido 2,2'-azinobis(3-eilbenzotiazoline-6-solfonico)).

Tale radicale, viene generato attraverso una reazione di ossidazione del composto incolore ABTS (figura 2.9); inizialmente l'agente ossidante impiegato era la metmioglobina, successivamente si è passati a MnO_2 , ed infine, nel lavoro di Re et al, si è impiegato il più comune e facilmente reperibile persolfato di sodio o di potassio ($K_2S_2O_8$ o $Na_2S_2O_8$)[31].

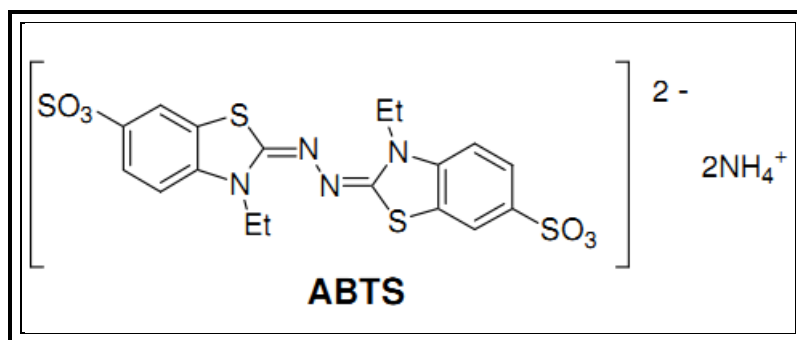


Figura 2.9. Struttura molecolare dell'ABTS non radicalico.

Il catione radicalico così generato è molto stabile nel tempo, ed è caratterizzato da una intensa colorazione blu-verde (con massimi di assorbimento localizzati a 415, 645, 734 e 815 nm) (figura 2.10); in seguito all'aggiunta di uno o più antiossidanti nell'ambiente di reazione, questi cedono uno o più atomi di idrogeno al radicale cationico, determinando così un decremento del valore iniziale dell'assorbanza valutato alla λ_{max} .

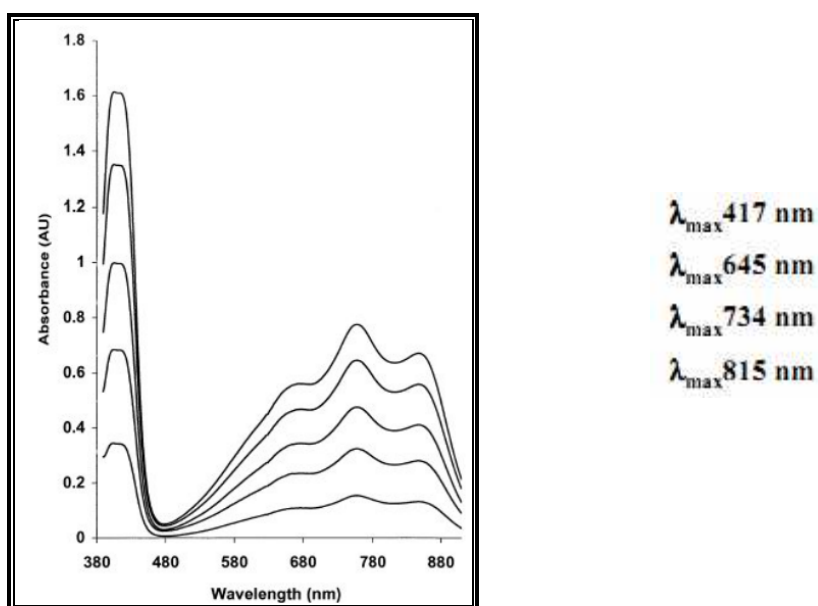


Figura 2.10 Spettro di assorbimento del radicale $ABTS^{\cdot+}$ [31].

La quantificazione dell'AOC per un generico composto antiossidante, si ottiene da una retta di calibrazione, che mette in relazione la perdita del segnale di assorbanza con la concentrazione di antiossidante aggiunto in cuvetta.

Il metodo prende anche il nome di TEAC (acronimo di Trolox[®] Equivalent Antioxidant Capacity), perchè riporta i valori di AOC dei vari campioni, come Trolox[®] equivalenti, ovvero la concentrazione millimolare di una soluzione di Trolox[®] che ha la stessa capacità antiossidante di una soluzione 1mM della soluzione del composto o miscela da investigare. [31,32].

Il Trolox[®] viene utilizzato anche come probe di riferimento per confrontare i valori dei vari AOC, relativi ai diversi composti antiossidanti, al fine di poter definire un trend di capacità antiossidante tra le varie molecole.

Il meccanismo di reazione tra ABTS^{•+} e Trolox[®], che avviene secondo la modalità di trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT), viene indicata in figura 2.11:

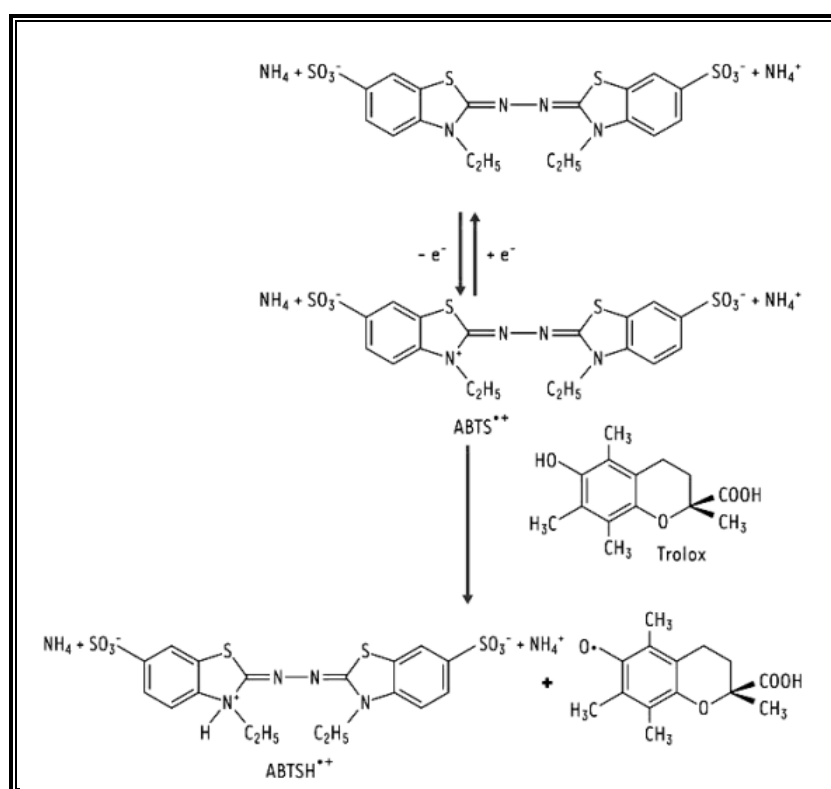


Figura 2.11 Meccanismo di reazione HAT tra ABTS^{•+} e Trolox[®].

Il metodo ABTS, è un metodo di facile impiego, altamente utilizzato nei laboratori di ricerca, per la determinazione dell'AOC in campioni alimentari e biologici. Poichè l'ABTS è ben solubile sia in ambiente acquoso che in solvente organico, la metodica può essere sfruttata ampiamente per la determinazione dell'AOC sia per composti idrofili che lipofili. Inoltre questo saggio, data la sua semplicità e la vastità di applicazione, è stato il primo ad essere

stato commercializzato sotto forma di kit per la misura dell'AOC, da parte dei laboratori della ditta statunitense Randox® (figura 2.12):



Figura 2.12 Kit Randox® per il saggio ABTS.

2.5)Metodo DPPH.

Tra i saggi spettrofotometrici impiegati per la determinazione dell'AOC, viene molto sfruttato, soprattutto a livello di routine, il saggio DPPH. Il DPPH(2,2'-Difenil-1-picrilidrazile) (figura 2.13) è un radicale organico azotato, leggermente stabile nei confronti delle radiazioni solari, per il fatto che l'elettrone spaiato, situato sull'atomo di azoto, viene stabilizzato per risonanza sull'anello aromatico; inoltre la presenza di gruppi stericamente ingombranti come quelli fenilici e quelli nitro, conferisce una ulteriore stabilità al radicale stesso[33].

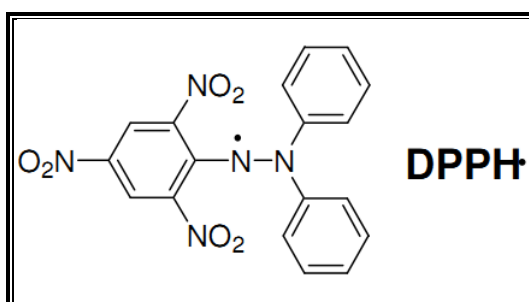


Figura 2.13 Struttura molecolare del radicale DPPH·.

La funzione principale dei gruppi nitro è essenzialmente quella di far sì che il composto possa assorbire radiazioni nel range UV-Vis, e che quindi possa essere monitorato per via spettrofotometrica. Gli spettri di assorbimento del composto radicalico e non vengono riportati in figura 2.14; il DPPH oltre che spettrofotometricamente può essere monitorato

anche mediante spettroscopia di risonanza di spin elettronico (EPR), oppure mediante tecniche elettroanalitiche quali la cronoamperometria.

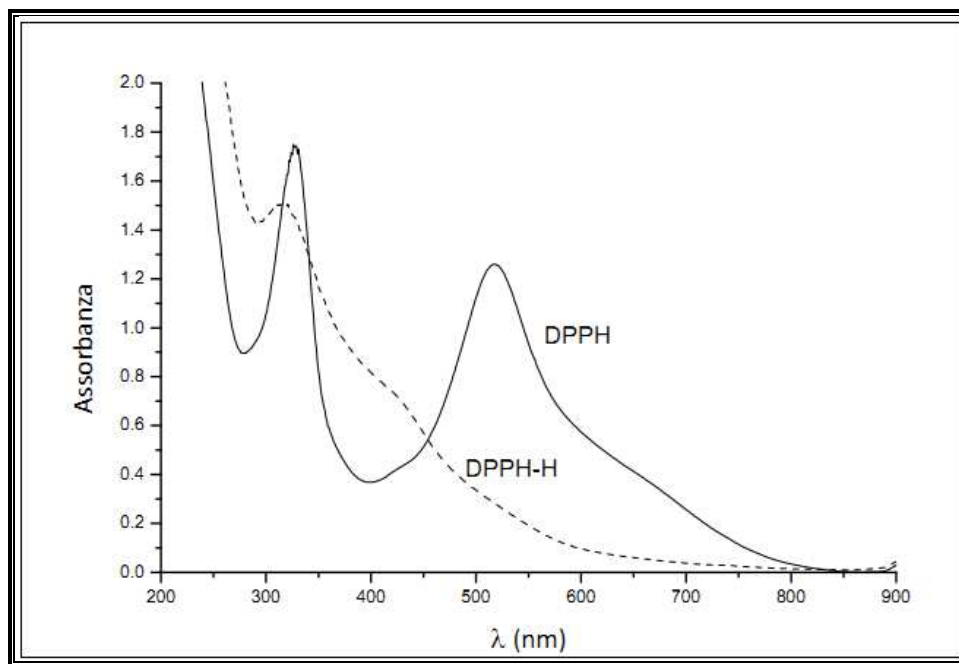


Figura 2.14 Spettro di assorbimento del DPPH radicalico e non.

Facendo reagire il DPPH^\bullet con un composto antiossidante in grado di cedere un atomo di idrogeno al composto radicalico (figura 2.15), si verifica una decolorazione della soluzione dovuta alla scomparsa del radicale, che può essere monitorata nel tempo per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento ($\lambda_{\text{max}} = 516\text{nm}$).

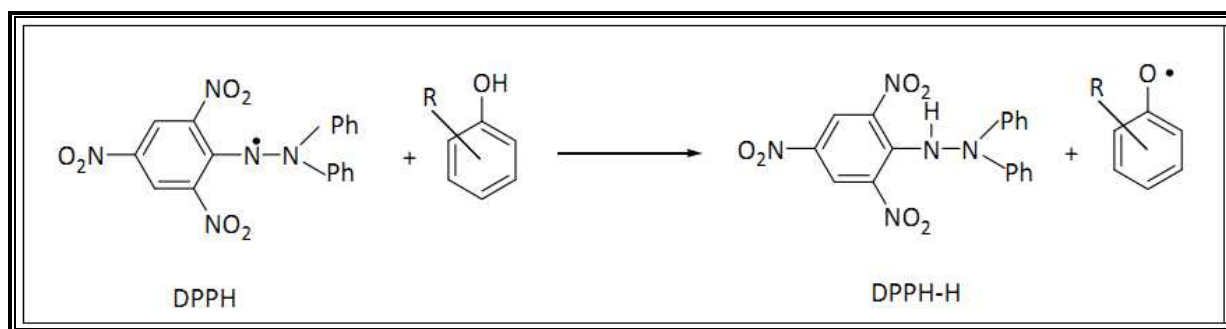


Figura 2.15 Meccanismo di reazione per il DPPH^\bullet .

Inizialmente si riteneva che il meccanismo di azione antiossidante fosse di tipo HAT, in seguito, diversi studi [19], hanno confermato che il fenomeno di decolorazione può avvenire sia per cessione di atomo di idrogeno(HAT), sia per trasferimento elettronico. Sulla base della cinetica di decolorazione del radicale DPPH, si va poi a valutare la concentrazione di

antiossidante necessaria a garantire un decadimento del 50% del valore iniziale di assorbanza (EC_{50})[34,35].

Il saggio DPPH opera in soluzioni alcoliche e idroalcoliche di metanolo o etanolo, per cui permette l'analisi di una svariata serie di composti antiossidanti, sia idrofilici che lipofilici.

Uno svantaggio del metodo deriva dal fatto che la reazione tra il DPPH e l'antiossidante, dipende fortemente dall'accessibilità che tali molecole hanno verso il sito radicalico: da ciò ne consegue che molecole meno ingombrate stericamente, e che quindi accedono meglio all'elettrone spaiato, possano avere un valore di AOC più elevato di quello reale [19].

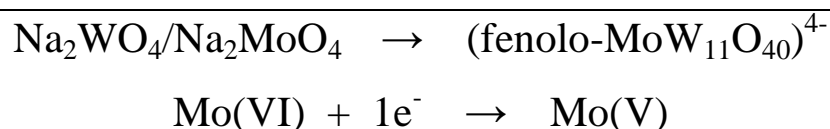
2.6)Metodo di Folin-Ciocalteu.

Il metodo storicamente più importante e più applicato per stimare il valore dell'AOC, è quello proposto da Folin e Denis (1912) e successivamente modificato da Folin e Ciocalteu (1927)[36] per la determinazione della tirosina. Il metodo si basa sull'aggiunta di un particolare reattivo ossidante, detto reattivo di Folin-Ciocalteu (FC), in grado di assumere una colorazione blu, la cui intensità risulta essere linearmente proporzionale al numero di residui fenolici presenti sulla molecola di antiossidante[37,38].

Per tale ragione il reattivo FC viene impiegato per la determinazione del contenuto totale dei polifenoli, soprattutto in campioni reali quali vini ed estratti naturali[37,38].

Il reattivo di Folin e Ciocalteu è costituito da una miscela di color giallo, a base di acido fosfotungstico $H_3PW_{12}O_{40}$ e fosfomolibdico $H_3PMo_{12}O_{40}$, in grado di ossidare substrati polifenolici e altre molecole antiossidanti quali acido ascorbico, riducendosi ai rispettivi ossidi W_8O_{23} e Mo_8O_{23} , in grado di conferire alla soluzione una intensa colorazione blu.

Lo schema di reazione, tratto dalla review di Prior et al.[19], che avviene mediante trasferimento elettronico (ET), può essere così schematizzato:



La reazione di ossidazione del substrato polifenolico deve essere condotta a pH alcalini intorno al valore di 10 (soluzione di Na_2CO_3), per accelerare la cinetica della reazione stessa.

La miscela degli ossidi di W_8O_{23} e Mo_8O_{23} presenta un'ampia zona di assorbimento compresa tra 720 e 750 nm, Singleton et al. suggeriscono di condurre la misura spettrofotometrica a

765nm [38]. Un esempio degli spettri di assorbimento del reattivo FC, in presenza e in assenza di un composto polifenolico, viene indicata in figura 2.16:

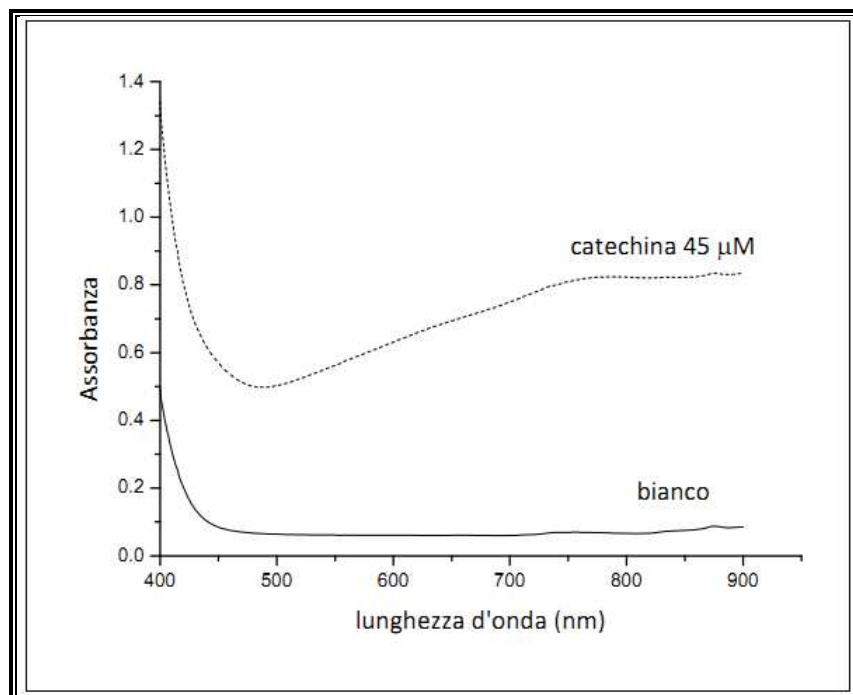


Figura 2.16 Spettro di assorbimento del reattivo FC in presenza e assenza di un polifenolo (catechina).

Nella procedura di Singleton et al.[38], viene usato come standard con cui esprimere il contenuto totale di fenoli l'acido gallico (figura 1.24), per cui si parla di di acido gallico equivalenti o GAE(Gallic Acid Equivalents); in particolar modo per le sostanze pure si usa l'unità di misura mmol/L di acido gallico equivalenti e per i campioni reali si adotta l'unità di misura in mg/L di acido gallico equivalenti[37,38].

Dal momento che il metodo di Folin-Ciocalteu non è specifico per i soli composti polifenolici, in quanto vengono ossidati anche altri substrati facilmente riducibili, si possono ottenere risultati sovrastimati per il contenuto totale di polifenoli.

A meno che gli interferenti, non vengano rimossi dalla matrice, il metodo non determina il contenuto totale dei polifenoli, ma può essere comunque una misura del potere riducente totale, un parametro importante per la valutazione dello stato redox cellulare[9].

Un possibile confronto tra i vari saggi standard sopracitati, può essere effettuato in termini di semplicità di esecuzione, strumentazione richiesta, rilevanza biologica, meccanismo di reazione, capacità di analisi di composti idrofilici e lipofilici e modalità di quantificazione e misura dell'indice AOC (tabella 2.3) [19].

antioxidant assay	simplicity	instrumentation required	biological relevance	mechanism	endpoint	quantitation	lipophilic and hydrophilic AOC
ORAC	++ ^a	+	+++	HAT	fixed time	AUC	+++
TRAP	--- ^b	-- specialized	+++	HAT	lag phase	IC ₅₀ lag time	--
FRAP	+++	+++	--	SET	time, varies	ΔOD fixed time	---
CUPRAC	+++	+++	--	SET	time	ΔOD fixed time	---
TEAC	+	+	-	SET	time	ΔOD fixed time	+++
DPPH	+	+	-	SET	IC ₅₀	ΔOD fixed time	-
TOSC	-	-	++	HAT	IC ₅₀	AUC	---
LDL oxidation	-	+++	+++	HAT	lag phase	lag time	---
PHOTOCHEM	+	-- specialized	++	?	fixed time	lag time or AUC ^c	+++

^a+, ++, +++ = desirable to highly desired characteristic. ^b-, --, --- = less desirable to highly undesirable based upon this characteristic. ^cThe lipophilic assay is quantitated by AUC measured over a defined measuring time, and the hydrophilic assay is quantitated based upon the lag phase.

Tabella 2.3. Confronto tra i vari metodi standard per la misura dell'AOC[19].

2.7)Approccio Potenzimetrico alla misura dell'AOC.

Si può facilmente notare come le metodiche sopra descritte per la quantificazione dell'indice AOC, si basino sulla valutazione e quantificazione di una reazione di riduzione.

Infatti ogni test, va ad investigare l'abilità della specie antiossidante di ridurre i composti radicalici, mediante o cessione di elettroni (ET) o di atomi di idrogeno (HAT).

Nel 2006, sulla rivista Talanta[39], è stato pubblicato un metodo potenziometrico per la misura del parametro AOC. Il metodo si basa sulla considerazione che i principali inibitori e scavenger radicalici siano composti elettron donatori , per cui la valutazione del consumo di un determinato “mediatore redox correttamente scelto”, può fornire utili informazioni sulla attività e capacità antiossidante.

I ROS per definizione sono dei potenti agenti ossidanti, infatti possiedono elevati valori di potenziale standard redox; a titolo di esempio il radicale idrossile possiede un $E^{\circ}_{OH/OH^{\cdot-}} = +2.31V$ vs SHE.

I potenziali Red/Ox dei vari agenti antiossidanti più ampiamente utilizzati in campo chimico/biologico, si assestano su di un range di valori compreso tra $-0.42 \div +0.30$ V.

Sulla base del confronto tra i potenziali di ossido/riduzione per la specie ossidante e riducente, si può dedurre che il potenziale Red/Ox del mediatore necessario per la valutazione dell'AOC, debba soddisfare il seguente requisito:

$$E^{\circ}_{Rad/Rad(Red)} > E^{\circ}_{Ox/Red} > E^{\circ}_{AO\ Ox/AO\ Red}$$

dove $E^{\circ}_{\text{Rad}/\text{Rad}(\text{Red})}$ corrisponde al potenziale standard della coppia forma ossidata e forma ridotta della specie radicalica all'ossigeno, $E^{\circ}_{\text{Ox}/\text{Red}}$ è il potenziale redox del sistema mediatore ed infine $E^{\circ}_{\text{AO Ox}/\text{AO Red}}$ è il potenziale redox per il composto antiossidante.

Un altro importante requisito che deve presentare il sistema mediatore redox, grazie al quale effettuare l'analisi potenziometrica, è quello di possedere una elevata velocità di reazione chimica con l'antiossidante.

Il sistema mediatore proposto da Brainina et al.[39], è la coppia $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ valutata in ambiente tamponato a pH 7.4; l'aggiunta di un'aliquota di antiossidante a titolo noto, determina uno spostamento o shift del potenziale della coppia redox del sistema mediatore.

Prima(1) e dopo(2) l'aggiunta di antiossidante, il potenziale può essere calcolato, secondo l'equazione di Nernst, nel seguente modo:

$$E1 = E^{\circ} + b * \log \frac{C_{\text{ox}}}{C_{\text{red}}} \quad (1)$$

$$E2 = E^{\circ} + b * \log \frac{(C_{\text{ox}} - X)}{(C_{\text{red}} + X)} \quad (2)$$

oppure monitorato per via potenziometrica mediante un elettrodo indicatore di Pt e un elettrodo al calomelano saturo(SCE), impiegato in qualità di elettrodo di riferimento.

L'attività antiossidante (AOC), può essere poi determinata quantitativamente con la seguente espressione:

$$AOC = \pm \frac{C_{\text{ox}} - \alpha * C_{\text{red}}}{1 + \alpha}$$

dove E1 ed E2 corrispondono al potenziale che il sistema assume prima e dopo l'aggiunta di una aliquota di antiossidante, E° è il potenziale standard del sistema mediatore, C_{ox} e C_{red} è la concentrazione del sistema mediatore nella forma ossidata e ridotta, X è la concentrazione di antiossidante che reagisce espressa come [eq/L], ed infine $\alpha = 10^{(E2 - E1)/b}$ e $b = (2.303 \cdot R \cdot T)/(nF)$ (pendenza della retta).

Dal momento che la forza ionica della soluzione rimane pressochè invariata durante tutto il corso dell'analisi e che la misura della differenza di potenziale non è un valore assoluto, è possibile assumere in prima istanza, che la concentrazione coincida con l'attività.

CAPITOLO 3

DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE CON ELETTRODI MODIFICATI.

3.1) Metodo proposto da Scholz et al.

La maggior parte delle tecniche spettrofotometriche, benchè altamente selettive e specifiche per alcuni radicali, sono frequentemente difficili da correlare tra loro, soprattutto se applicate a sistemi chimico/biologico reali[40].

Il seguente paragrafo illustra un nuovo approccio elettrochimico finalizzato ad investigare in maniera indiretta la capacità antiossidante, dove un particolare radicale generato in situ, va a degradare un film depositato sull'elettrodo di lavoro(WE)(figura 3.1).

Scholz et al[40], sfruttano la degradazione indotta da ROS su SAM (Self Assembled Monolayer) di alchil tioli su elettrodi di Au o Hg, per la una determinazione relativa dei ROS stessi .

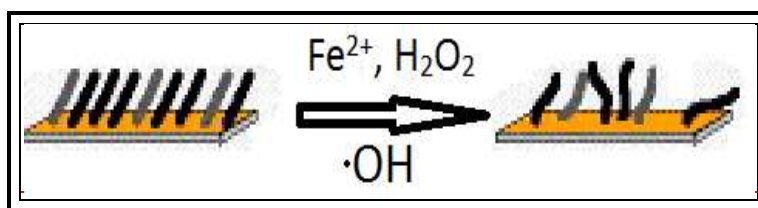


Figura 3.1. Degradazione di un film depositato su un WE, con fonte di radicali $\text{OH}\cdot$.

Tale metodo, prevede di monitorare il grado % di danneggiamento del film, durante l'esposizione all'azione radicalica ossidante, attraverso misure di Voltammetria Ciclica (CV) con il probe red/ox reversibile $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$. Quindi si va a monitorare l'incremento del picco anodico (o catodico) del probe red/ox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ a diversi tempi di esposizione all'azione radicalica. Il segnale, assente per l'elettrodo modificato con il SAM (fig. 3.2 curva b), aumenta all'aumentare del tempo di esposizione alla miscela radicalica (fig 3.2 curve c e d), fino quasi a raggiungere il valore della corrente di picco (I_p) dell'elettrodo nudo(fig 3.2 curva a).

Questa metodologia è stata utilizzata da Hilgemann et al.[41], per la determinazione della capacità antiossidante. I radicali sono stati generati in soluzioni di Fe^{2+} ed H_2O_2 ad un pH ottimale di 4.6, ottenuto con tampone acetato . Il metodo citato può essere utilizzato per la valutazione della capacità antiossidante di un composto puro o di una miscela, sulla base della

abilità di proteggere il SAM dalla degradazione da parte dei ROS. Poichè tale saggio, risponde all'azione ossidante dei radicali all'ossigeno, in particolar modo per gli $\text{OH}\cdot$, può fornire informazioni a livello biologico più rilevanti rispetto ad altri saggi quali il DPPH o ABTS, che sfruttano composti radicalici molto meno reattivi e non presenti nel nostro organismo.

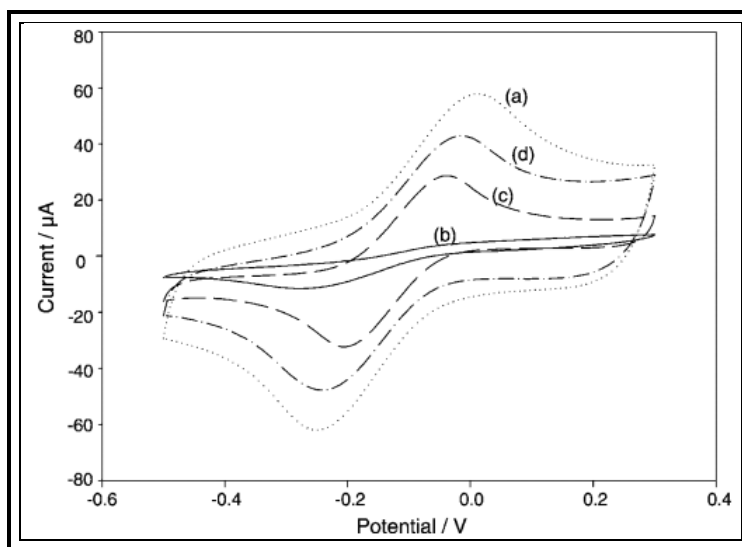


Figura 3.2. Voltammogramma del probe $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ in tampone acetato a diversi tempi di esposizione[41].

Dall'articolo di Hilgemann et al.[41], l'attività antiossidante può essere convenientemente espressa considerando il decadimento esponenziale del segnale elettrochimico, normalizzato al valore I_0 , che è la corrente di picco dell'elettrodo nudo ($1 - I/I_0$) oppure in termini logaritmici come $\ln((1 - I/I_0))$ (figura 3.3 “a” e “b”). Il processo è controllato da due diverse costanti cinetiche. L'attività antiossidante è valutata mediante la seconda costante cinetica.

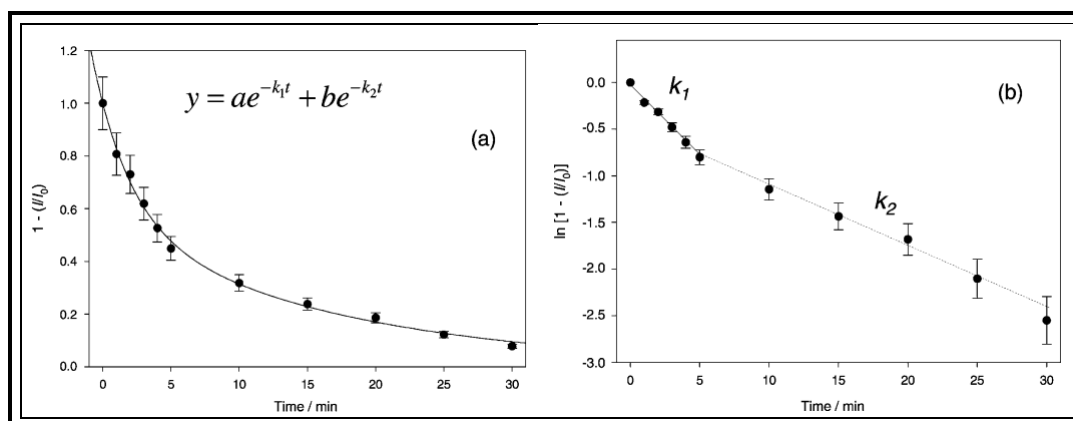


Figura 3.3 “a”e”b”. Modalità di espressione del recupero di corrente dopo attacco radicalico degli $\text{OH}\cdot$ [41].

Nell'articolo di Hilgemann et al.[41], in presenza di campioni caratterizzati da una elevata concentrazione di antiossidanti si riscontrava un maggior danneggiamento del film, fattore non facilmente spiegabile da un punto di vista teorico.

La figura 3.5, tratta dal lavoro di Hilgemann[41], relativa all'analisi di un estratto naturale, mostra questo comportamento anomalo: la curva i cui punti sperimentali sono indicati da cerchietti, relativa al campione più concentrato di estratto(1000mg/L), è quella caratterizzata da un grado di danneggiamento maggiore e più repentino.

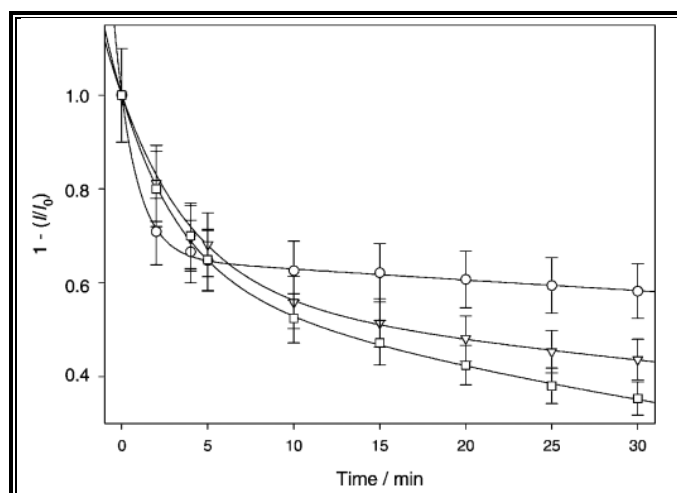


Figura3.4.Curve cinetiche di degradazione per estratti naturali a diversa concentrazione [41].

(○=1000mg/L; ▽=200mg/L; □=100mg/L)

Benchè tale approccio di valutazione elettrochimica della capacità antiossidante, abbia dato risultati anomali e contrastanti e la pubblicazione non sia stata in grado di giustificarli, potrebbe comunque essere una via interessante e alternativa da percorrere, mediante opportune modifiche ed ottimizzazioni, dal momento che misura la risposta verso specie radicaliche che sono realmente presenti in sistemi viventi.

3.2)Variazioni del metodo:scelta del film da depositare sul WE.

3.2.1)Deposizione di Film Polipirrollico.

Nel laboratorio presso cui è stato svolto il lavoro di tesi si è cercato di ottimizzare l'approccio portato avanti da Scholz e Hilgemann.

In una prima fase si è depositato un film polipirrollico sul WE (figura 3.5). In questo caso, diversamente da quanto descritto da Scholz per il SAM di alchiltioli, si valuta il grado di sovraossidazione del polimero e la sua conseguente riduzione di carica associata al processo di conduzione del film.

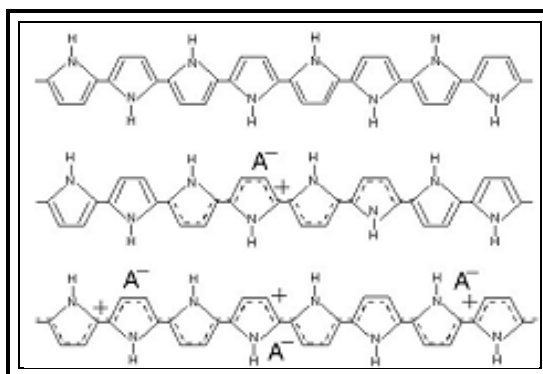


Figura 3.5 Struttura del polipirrolo(sopra) e del polipirrolo ossidato(sotto).

La quantificazione della capacità antiossidante, viene ottenuta sottoponendo il film depositato, all'azione dei radicali $\text{OH}\cdot$ generati tramite la Fenton; i radicali determinano una sovraossidazione del film con conseguente diminuzione della corrente, misurata a diversi tempi di esposizione tramite voltammetria ciclica.

Si sono condotte prove preliminari registrando CV prima e dopo l'attacco dei radicali (figura 3.6), con tempo di esposizione di 5 minuti, utilizzando diverse concentrazioni di H_2O_2 (10, 25, 50, 75, 100, 200 e 300mM) (figura 3.7).

Il problema maggiormente riscontrato nell'uso di tale film polimerico, deriva soprattutto da una limitata sensibilità, dal momento che la percentuale di degradazione del film è piuttosto limitata e non supera il 25%(figura 3.7). Per questo motivo abbiamo valutato un altro tipo di film da depositare sul WE.

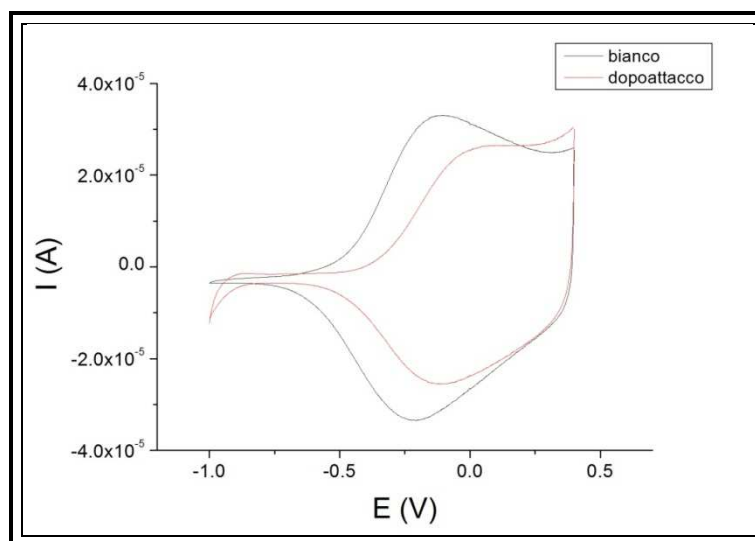


Figura 3.6. CV in LiClO_4 0.1 M HClO_4 0.01 M del polipirrolo prima e dopo attacco di 5 minuti con la Fenton ($[\text{Fe}^{2+}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mM}$) .

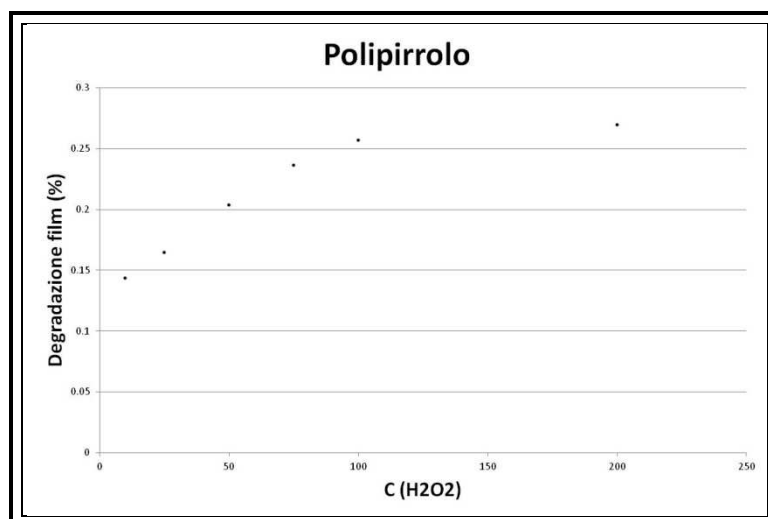


Figura 3.7. Decremento percentuale della carica del picco caratteristico del polipirrolo vs [H₂O₂] utilizzata nella Fenton con [Fe²⁺]=50 mM.

3.2.2) Deposizione di Film Polifenolico.

La modifica elettrodica che ha mostrato le caratteristiche più promettenti, si è ottenuta attraverso la polimerizzazione in ambiente acido del fenolo. Il film ottenuto è analogo a quello già descritto da Gattrell et al.[42]. L'elettropolimerizzazione del fenolo genera un polimero dove le unità monomeriche sono legate tramite i legami C—C; in questo modo vengono mantenute intatte quasi tutte le funzionalità ossidriliche, le quali conferiscono al polimero un buon grado di reattività verso specie radicaliche ossidanti. Il film che si ottiene sulla superficie dell'elettrodo, è molto aderente, impermeabile e si ossida molto lentamente all'aria. Lo schema di reazioni che conducono alla formazione del film, è il seguente (figura 3.8):

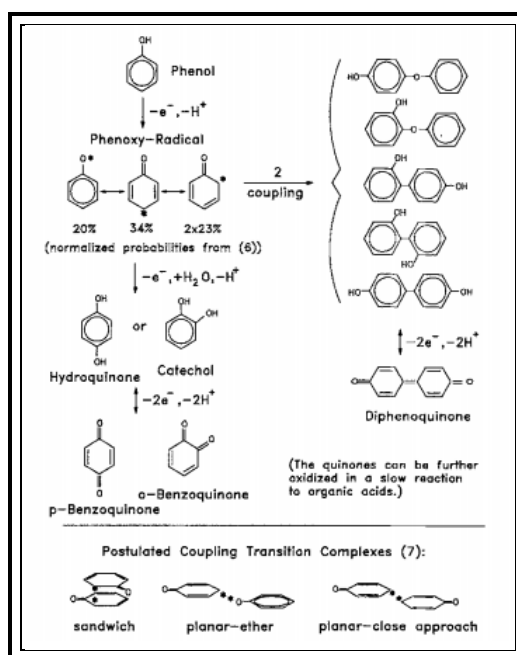


Figura 3.8. Schema di reazione per l'elettropolimerizzazione del fenolo[42].

La struttura del polimero depositato sull' elettrodo è stata identificata da Gattrell e al[42](figura 3.9):

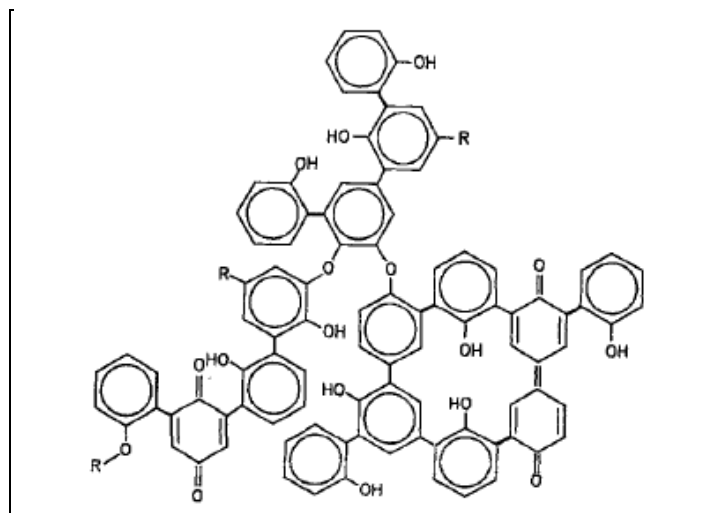


Figura 3.9. Struttura molecolare del polimero fenolico elettrodepositato[42].

Come si nota, il polimero è molto ramificato e ha mantenuto, durante la scansione anodica del potenziale, buona parte dei gruppi ossidrilici di partenza.

A livello di struttura molecolare mostra una elevata analogia, coi composti polifenolici: una ampia presenza di gruppi —OH in grado di spegnere radicali per cessione di atomi di idrogeno e un denso sistema di elettroni π , in grado di stabilizzare l'elettrone spaiato per delocalizzazione sull'anello aromatico. Questo film polimerico è stato utilizzato con successo nella determinazione del radicale $\text{OH}\cdot$ nel laboratorio presso cui è stato svolto questo lavoro di tesi. Attraverso l'applicazione del modello pinhole [44], è stato possibile valutare, da prove cronoamperometriche, l'area dell'elettrodo scoperta e osservare come miscele di Fenton più aggressive portino a una maggiore degradazione del film, come evidenziato dai risultati in figura 3.11.

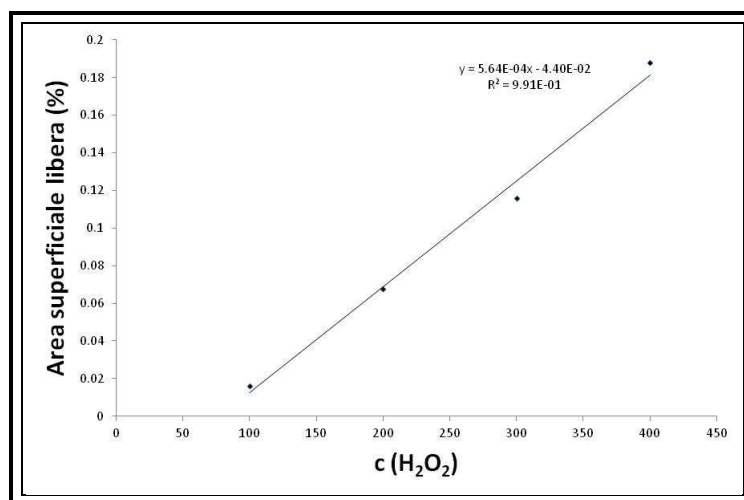


Figura 3.10. Andamento dell'area superficiale libera in funzione della concentrazione di H_2O_2 .

4) SCOPO

Lo scopo di questo lavoro di tesi, è quello di mettere a punto e perfezionare una metodica elettrochimica di screening, basata su misure in CV e CA e finalizzata a classificare e quantificare il valore di AOC per diverse molecole sonda di antiossidanti e, possibilmente, per campioni reali.

Tra gli antiossidanti vitaminici, sono stati investigati la Vitamina C (o (L)-Acido Ascorbico) e il Trolox® (molecola ampiamente utilizzata in letteratura come riferimento per esprimere il parametro AOC) e tra i polifenoli, l'acido gallico, il pirogallolo, la (-)-epicatechina e la quercetina. I dati ottenuti dalle prove elettrochimiche, sono stati successivamente confrontati con quelli ricavati da diversi metodi analitici standardi ed ufficiali, descritti nel capitolo 2, al fine di poter trovare una qualche correlazione nel trend del potere antiossidante.

CAPITOLO 5

PARTE SPERIMENTALE

Vengono di seguito riportate tutte le specifiche relative ai reagenti e alla strumentazione analitica utilizzata, per la realizzazione delle prove sperimentali.

5.1) Reagenti utilizzati.

NOME	DITTA PRODUTTRICE	PUREZZA 0 TITOLO	MASSA MOLECOLARE [g/mol]
Fenolo	Carlo Erba	99.5%	94.114
H ₂ O ₂	Sigma Aldrich	30% w/w	34.01
[Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃	Sigma Aldrich	98%	309.61
Fe(SO ₄)*7H ₂ O	Carlo Erba	99.5%	278.05
CH ₃ COOH	J.TBaker	99%	60.05
CH ₃ COONa	Carlo Erba	99.5%	136.08
K ₂ HPO ₄	Riedel de Haen	98%	174.18
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich	99.5%	136.09
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Riedel de Haen	99%	329.25
K ₄ [Fe(CN) ₆]*3H ₂ O	Merck	99%	422.41
(L)-Acido Ascorbico	Sigma Aldrich	99%	176.12
Trolox [®]	Sigma Aldrich	97%	250.29
Acido Gallico	Sigma Aldrich	99%	170.12
Pirogallolo	Fluka	98%	126.11
(-)-Epicatechina	Sigma Aldrich	90%	290.3
Quercetina	Sigma Aldrich	98%	338.26
DPPH	Sigma Aldrich	99%	394.32
ABTS	Sigma Aldrich	99%	548.68
Reattivo di Folin- Ciocalteu	Merck	/	/
Sodio Fluoresceinato	Fluka	99%	376.28
AAPH	Sigma Aldrich	97%	271.20
Na ₂ CO ₃ *10H ₂ O	Carlo Erba	99.5%	286.14
Na ₂ S ₂ O ₈	Carlo Erba	97%	238.11

H ₂ SO ₄	J.TBaker	95%	98.08
CH ₃ OH	Fluka	99.8%	32.04
KMnO ₄	J.TBaker	0.1N	158.04
CH ₃ Cl ₃	Fluka	99%	119.38

Tutte le soluzioni acquose sono state preparate con acqua deionizzata per osmosi inversa e successivamente sottoposte ad una fase di distillazione in un apparato di vetro.

5.2)Strumentazione

DENOMINAZIONE	SPECIFICHE
CH INSTRUMENTS Electrochemical WorkStation (Potenziostato)	Modello 660C É stata utilizzata una comune cella a tre elettrodi con: <ul style="list-style-type: none"> • WE: Glassy Carbon(diametro=2mm), mod AG CH-9101 Metrohm; • RE: SCE,mod.303/SCG/6J • CE: Filo di Pt
POTENZIOMETRO/pH-metro	Mod.338, AMEL INSTRUMENTS Elettrodi impiegati: <ul style="list-style-type: none"> • Indicatore: Filo di Pt • Riferimento: SCE, mod.303/SCG/6J • Elettrodo a vetro combinato, mod 211/SGG/12, AMEL
SPETTROFOTOMETRO UV/VIS	Mod. CARY 1E, VARIAN, Doppio raggio con detector tubo fotomoltiplicatore
SPETTROFLUORIMETRO	Spettrofluorimetro FLSP 90 Edimburgh Instruments, con lampada allo Xe 450W
BILANCIA ANALITICA	AT21 Comparator, Mettler Toledo Precisione:±0.000001g Max:22g
BILANCIA ANALITICA	SCALTEC SPB32 Precisione:+0.0001g Max:120g
LAMPADA A POOL DI Hg	Modello UV 17F(low pressure) , Italquarz
SPETTROMETRO FT-IR	Modello Spectrum 2000, Perkin Elmer

5.3) Software

Sono stati impiegati i seguenti software per l'acquisizione ed il trattamento dei dati sperimentali:

- Software CHI fornito con lo strumento CH INSTRUMENTS Electrochemical Workstation;
- Software CARY fornito con lo strumento CARY 1E;
- Software Edimburgh Instruments fornito con lo spettrofluorimetro FLSP90;
- Origin 7.0, impiegato per l'elaborazione dei grafici;
- Microsoft EXCEL.

Quest'ultimo, è stato largamente impiegato soprattutto per la costruzione delle rette di calibrazione con il metodo dei minimi quadrati, in modo tale da associare ad ogni temine delle retta (pendenza, intercetta e valore ottenuto della variabile indipendente) i rispettivi valori di incertezza s_m , s_b e s_x [42,43]. Viene riportato di seguito, un esempio del foglio EXCEL utilizzato per l'ottenimento della retta di calibrazione:

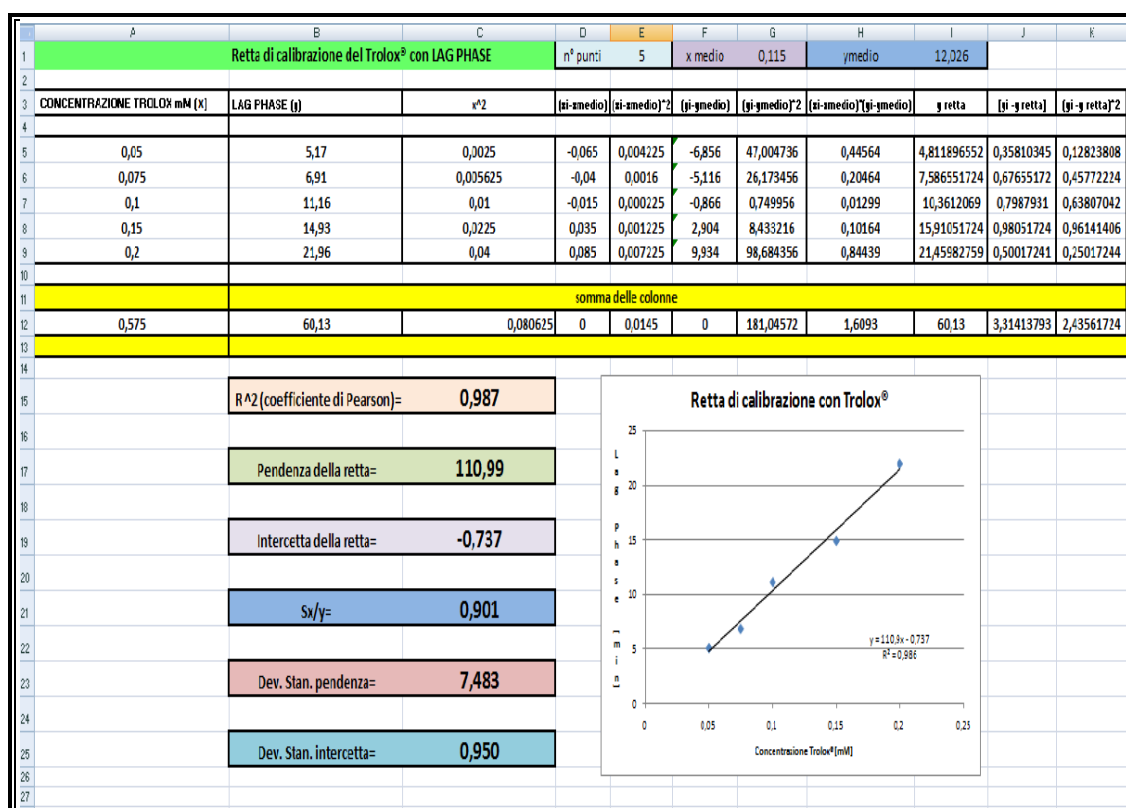


Figura 5.1. Foglio EXCEL per l'ottenimento della retta di taratura e trattazione dei minimi quadrati.

5.4.) Elettrodi modificati con polifenolo.

La preparazione e la caratterizzazione sono avvenute con le seguenti modalità.

Preparazione dell'elettrodo di GC: Prima di effettuare la modifica dell'elettrodo, la superficie è stata pulita meccanicamente, mediante fasi di lappatura su carte abrasive di granulometria sequenzialmente decrescente (2500 e 4000) e polvere di allumina (con diametro medio $0,05\mu\text{m}$) su panno bagnato con acqua. Lo scopo è quello di ottenere una superficie elettrodica lucidata a specchio (mirror surface), poichè i fenomeni elettrochimici sono fortemente influenzati dallo stato superficiale del materiale conduttivo. La superficie è stata caratterizzata con 10 cicli di voltammetria ciclica (figura 5.2) in una soluzione 5mM di $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ in tampone acetato 0.5 M, con velocità di scansione $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ tra 0.1 e -0.7 V. Queste condizioni vengono chiamate con l'acronimo CV1.

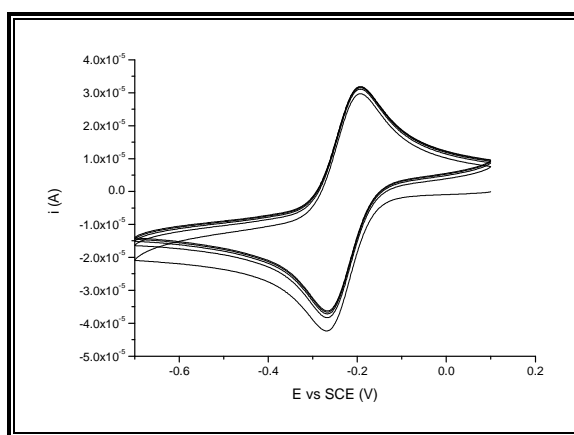


Figura 5.2. Voltammogramma ciclico di una soluzione 5mM di $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ in tampone acetato 0.5 M, con elettrodo GC nudo.

Deposizione del polimero fenolico sull'elettrodo: il polimero fenolico è stato sintetizzato per via potenziostatica ($t = 60 \text{ s}$ e $E = + 1.0 \text{ V}$), da una soluzione 0.05M di fenolo in H_2SO_4 1M. Il polimero così ottenuto è stato sottoposto ad una successiva fase di stabilizzazione attraverso una programmata di potenziale in CV (10 cicli; $E_i = + 0.8 \text{ V}$; $E_f = -0.2 \text{ V}$; $E_{\text{high}} = + 0.8 \text{ V}$). Il film è stato poi caratterizzato nelle condizioni CV1. I film che, una volta depositati sulla superficie elettrodica del WE, presentavano un trasferimento di carica residua, sono stati scartati. La figura 5.3 è un cronoamperogramma che mostra come la deposizione del film polifenolico sulla superficie elettrodica del WE, blocchi completamente il passaggio di corrente all'elettrodo, rendendo quest'ultimo isolante.

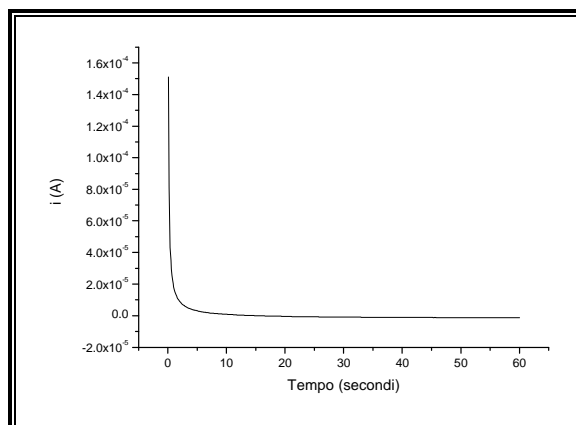


Figura 5.3 Deposizione del film fenolico sull'elettrodo di lavoro per via potenziostatica.

5.5) Caratterizzazione FT-IR del film di polifenolo.

Per effettuare la caratterizzazione IR del film polifenolico, si sono eseguite 5 deposizioni su elettrodi di lavoro in carbone vetroso di grande area superficiale (circa 1 cm^2) rispetto a quelli normalmente usati negli esperimenti elettrochimici. Al termine di ogni deposizione, il polimero, veniva solubilizzato con 4 ml di CHCl_3 ; la soluzione contenente il polimero veniva poi successivamente portata a secco in un vial, facendo gorgogliare in esso un flusso di gas azoto.

Il residuo veniva ridisciolti in cloroformio (0.2 mL) e mediante pipetta Pasteur, la soluzione veniva trasferita su una pasticca di KBr e lasciata evaporare, in modo tale da filmare nuovamente. Su questo film veniva registrato lo spettro IR in trasformata di Fourier.

In figura 5.4 viene riportato lo spettro IR del polimero fenolico.

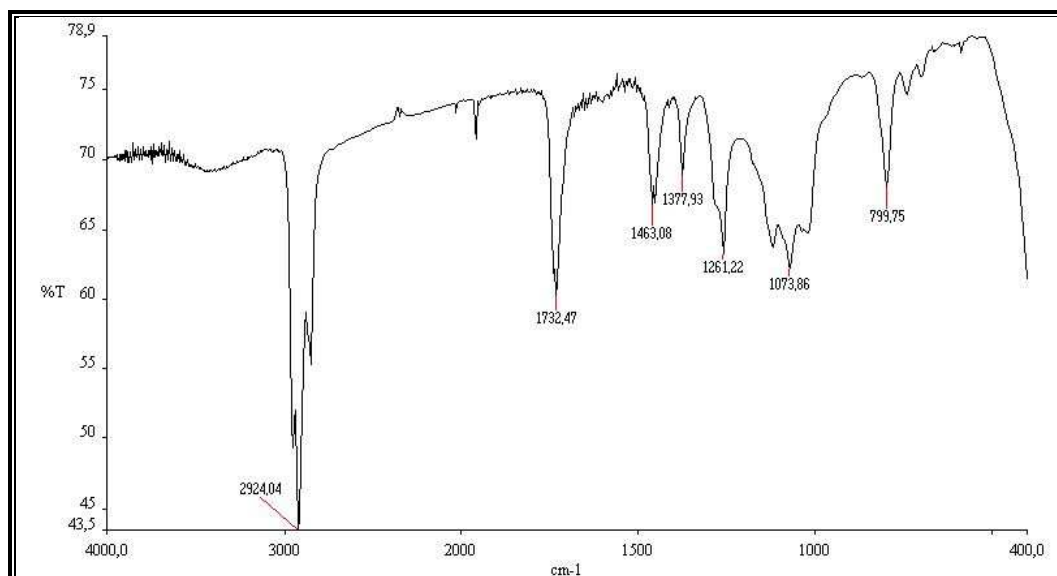


Figura 5.4 Spettro FT-IR del polimero polifenolico depositato sull'elettrodo di lavoro.

Dallo spettro FT-IR (figura 5.4), si possono individuare i seguenti assorbimenti:

- **3500÷3600 cm⁻¹**: stretching del legame O-H relativo alla funzionalità ossidrilica del fenolo. Lo stretching del gruppo idrossilico nello spettro di Gattrell et al.[42], cade a 3374 cm⁻¹;
- **2924 cm⁻¹**: stretching del legame C-H adiacente ad una funzionalità chinonica; nello spettro IR ottenuto da Gattrell et al., si notano picchi analoghi che cadono ai numeri d'onda di 2963, 2924 e 2853 cm⁻¹;
- **1732 cm⁻¹**: banda diagnostica dovuta allo stretching del legame carbonilico C=O; questo conferma molto chiaramente come la deposizione del polimero sull'elettrodo, attraverso una scansione potenziostatica in senso anodico, abbia ossidato i vari gruppi -OH in funzionalità chinoniche.
- **1463 cm⁻¹**: banda relativa allo stretching del legame C=C adiacente al sistema chinonico, nell'articolo di Gattrell (figura 5.5) tale segnale viene riscontrato a 1445cm⁻¹;
- **1261 cm⁻¹**: banda relativa allo stretching del legame C=C appartenente ai vari sistemi aromatici degli anelli accoppiati tra loro.

Dallo spettro FT-IR da noi registrato, si nota come la banda relativa allo stretching del gruppo ossidrilico sia poco intensa. Questo risultato dovrebbe derivare dal fatto che il potenziale anodico applicato per eseguire l'elettropolimerizzazione provoca l'ossidazione della maggior parte delle funzionalità -OH.

Ciò trova una ulteriore conferma nella presenza della banda diagnostica a 1732 cm⁻¹, relativa appunto allo stretching del legame carbonilico C=O, come già osservato.

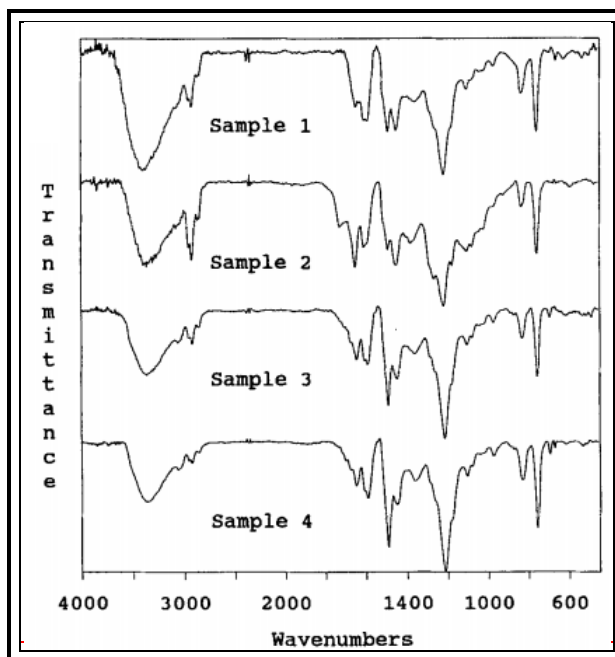


Figura 5.5 Spettro FTIR del Polifenolo, ottenuto a diverse concentrazioni di fenolo (sample1 50mM a 0.9V, sample 2 500mM a 0.9V, sample 3 200mM a 0.9V, sample 4 500mM a 1.2V)[42].

Il polimero così elettrodepositato sull'elettrodo da Gattrell et al., secondo le modalità del “sample1”(figura 5.5), mostra i seguenti segnali identificativi:

- 3400 cm^{-1} : stretching del legame O-H; la presenza di un picco molto intenso è una prova del fatto che la polimerizzazione avviene prevalentemente tra i legami C-C, mantenendo inalterati i gruppi idrossilici, in grado di svolgere una azione antiossidante;
- Sopra i 3000 cm^{-1} : stretching di C-H aromatici;
- $2900\div 2800\text{ cm}^{-1}$: stretching di C-H appartenenti a gruppi chinonici;
- 1600 cm^{-1} : stretching del doppio legame C=C del sistema chinonico;
- 1400 cm^{-1} : stretching del doppio legame C=C del sistema aromatico;
- $800\div 900\text{ cm}^{-1}$: bending fuori dal piano del C-H aromatico.

In tale spettro (figura 5.5) inoltre, è completamente assente il segnale relativo allo stretching carbonilico; questo è indice del fatto che l'elettropolimerizzazione nel lavoro di Gattrell[42], è avvenuta senza l'ossidazione dei gruppi ossidrilici.

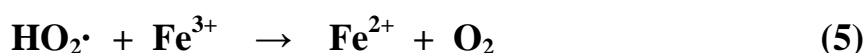
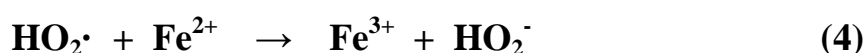
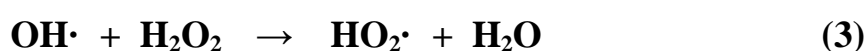
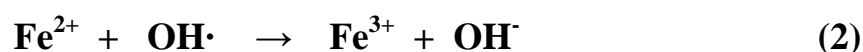
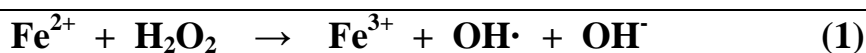
Nonostante il film da noi depositato non sia completamente simile a quello riportato in letteratura, per il fatto che presenta un grado di ossidazione più spinto e marcato dei gruppi ossidrilici, è stato comunque in grado di rendere perfettamente isolante la superficie dell'elettrodo di lavoro e, allo stesso tempo, di presentare una risposta selettiva nei confronti della degradazione operata dai radicali $\text{OH}\cdot$.

5.6) Degradazione del film di polifenolo

5.6.1) Reazione di Fenton

La reazione di Fenton è stata scoperta nel 1894, in seguito a studi finalizzati a valutare l'ossidazione dell'acido tartarico, da parte di H_2O_2 in presenza di Fe^{2+} in soluzione.

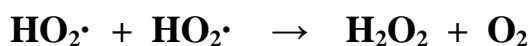
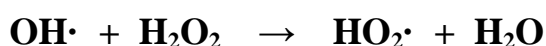
Il meccanismo più probabile con cui decorre la reazione è quello teorizzato da Barb et al.[44], che prevede la formazione del radicale idrossile $\text{OH}\cdot$, secondo i seguenti passaggi:



Lo schema sopraindicato è un meccanismo a catena, in cui il Fe^{2+} viene rigenerato, svolgendo un ruolo di catalizzatore.

5.6.2) Fotolisi dell' H_2O_2 .

Il meccanismo della reazione di fotolisi dell'acqua ossigenata, è meglio conosciuto rispetto alla reazione di Fenton, ed è sotto sinteticamente riportato [46]:



La produzione in situ del radicale idrossile, è stata effettuata mediante fotolisi, con lampada a vapori di Hg a bassa pressione, introdotta all'interno di un reattore in pirex, dal volume di 120ml (figura 5.7). Lo spettro di emissione, raffigurato in figura 5.6, mostra un massimo a circa 254nm. La concentrazione di H_2O_2 è stata fatta variare tra 1 mM e 500 mM e l'elettrodo modificato è stato introdotto in una posizione fissa all'interno del reattore, per tempi variabili.

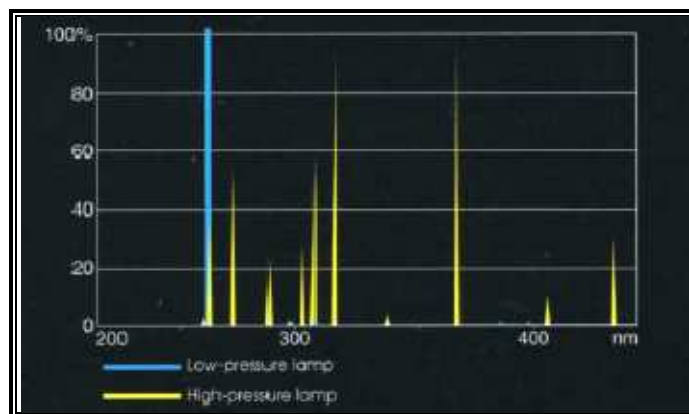


Figura 5.6 Spettro di emissione della lampada UV a vapori di Hg (max a 254nm) 18F della Ital Quarz in azzurro.

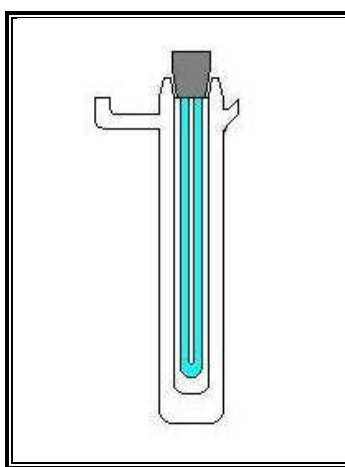


Figura 5.7 Geometria del reattore in pirex con lampada in quarzo.

5.6.3) Prove di bianco e interferenti

Sono state condotte alcune prove di controllo sul film polifenolico, che hanno mostrato come la presenza in soluzione della sola acqua ossigenata, di Fe(II), Fe(III) e dell'irraggiamento in assenza di H_2O_2 , non determinano alcuna degradazione del film.

Inoltre sono stati condotti degli esperimenti al fine di dimostrare che il principale radicale a cui risponde il film polifenolico è il radicale $OH\cdot$.

Il film polifenolico è stato sottoposto anche all'azione radicalica di alchil perossidi $ROO\cdot$, generati per decomposizione termica di una soluzione di AAPH 133 mM a $37^\circ C$; i risultati ottenuti dall'attacco dei radicali alchil perossidici, sono stati molto confortanti, per il fatto che, dalle misure voltammetriche eseguite successivamente, è emerso che il grado di danneggiamento del film è trascurabile. Queste prove mostrano quindi come il film

polifenolico depositato sull'elettrodo, abbia un certo grado di selettività nei confronti dell'azione degradante dei radicali $\text{OH}\cdot$.

Sono state inoltre effettuate prove di degradazione del film polifenolico con una soluzione di $\text{ABTS}^{\cdot+}$ $5.00 \cdot 10^{-4}$ M in tampone acetato 50 mM; tali misure hanno messo in evidenza che anche l'azione del radicale $\text{ABTS}^{\cdot+}$ non sia in grado di degradare il film.

Il film polifenolico risulta invece essere attaccato da forti ossidanti, quali ad esempio lo ione permanganato e lo ione bicromato che, tuttavia, non sono presenti nel nostro sistema di reazione.

5.6.3.1) Generazione del radicale $\text{OH}\cdot$ con reazione di Fenton.

La figura 5.8 mostra la variazione del voltamogramma registrato in condizioni CV1 per l'elettrodo nudo, l'elettrodo modificato e l'elettrodo modificato che ha subito un attacco da parte del radicale $\text{OH}\cdot$. La linea verde mostra il segnale registrato sull'elettrodo di glassy carbon nudo: il sistema di picchi di corrente della coppia redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ è ben visibile e il comportamento è perfettamente reversibile: la superficie è perfettamente conduttrice. La linea rossa mostra un voltamogramma registrato su di un elettrodo modificato con il film di polifenolo, che, essendo isolante, blocca completamente il passaggio di corrente e di conseguenza non è possibile riscontrare variazioni significative di corrente in tutto il range di potenziale esaminato. Infine il segnale nero è registrato su un elettrodo già degradato ad opera dei radicali $\text{OH}\cdot$ e quindi è possibile osservare nuovamente il segnale dovuto alla coppia $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$. L'entità della degradazione del film polifenolico è stata valutata nel seguente modo:

$$Deg = \frac{I_{pa}}{I_{pa}^0}$$

dove Deg è l'entità della degradazione, I_{pa} è la corrente di picco anodico registrata al quinto ciclo con l'elettrodo degradato e I_{pa}^0 è la corrente di picco anodica registrata al quinto ciclo registrata con l'elettrodo nudo.

Per valutare il potere antiossidante risulta più conveniente riferirsi alla superficie preservata dal composto antiossidante, espressa con la seguente equazione:

$$Cop = 1 - Deg = 1 - \frac{I_{pa}}{I_{pa}^0}$$

dove Cop rappresenta la frazione percentuale di superficie elettrodica ancora coperta dal polimero.

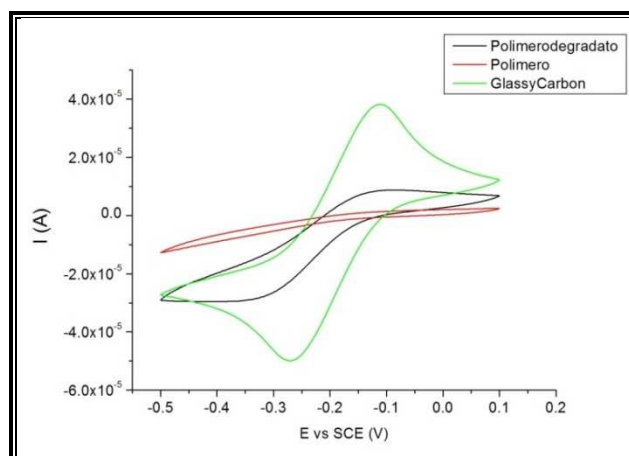


Figura 5.8. Voltammetrie cicliche registrate in tampone acetato 0.5 mM contenente la molecola sonda $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ 5 mM, all'elettrodo di GC tal quale, modificato con il polimero fenolico prima e dopo esposizione di 5 min ai radicali generati dalla reazione di Fenton ($[\text{Fe}^{2+}] = 0.4 \text{ M}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.4 \text{ M}$).

5.6.3.2) Generazione del radicale $\text{OH}\cdot$ con fotolisi dell'acqua ossigenata.

Sono state eseguite anche prove di degradazione del film polifenolico, monitorate tramite CV, generando i radicali $\text{OH}\cdot$ tramite fotolisi a diverse concentrazioni di H_2O_2 , al fine di poter determinare la concentrazione ideale di H_2O_2 . In particolare modo è stata valutata la degradazione che si è ottenuta con soluzioni 1, 10, 100, 250 e 500 mM di H_2O_2 , per un tempo di esposizione fisso di 10 minuti alla lampada. La figura 5.9 mostra il grado di danneggiamento del film fenolico, espresso come % di area libera sull'elettrodo.

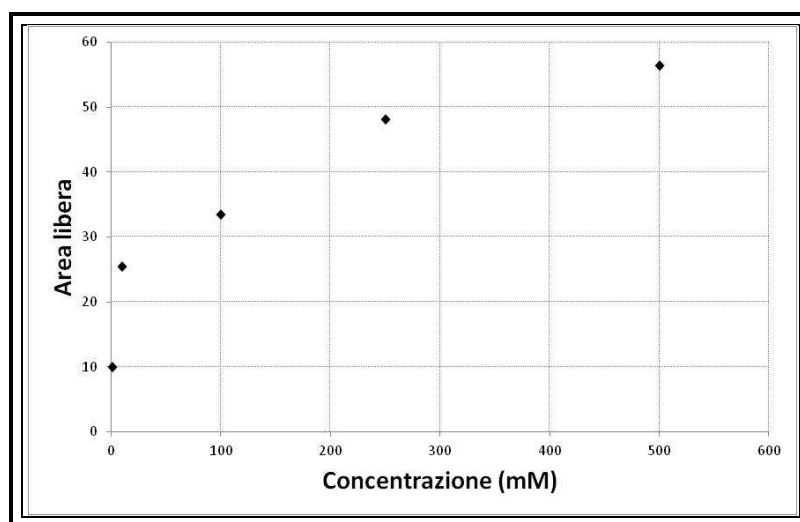


Figura 5.9. Area libera dell'elettrodo in funzione della $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

Si è scelto di operare con una concentrazione di acqua ossigenata 10 mM in quanto si ottiene ancora un buon segnale analitico, collegato all'effetto di una quantità di radicali generati

non estremamente rilevante che risulta essere proporzionale alla concentrazione di H_2O_2 . Questo permette di apprezzare l'effetto antiossidante di composti presenti a basse concentrazioni in soluzioni di riferimento o in campioni reali. Inoltre si osserva una minore formazione di bolle di ossigeno, generate dall'accoppiamento delle varie forme del radicale superossido, diversamente protonate, che possono inficiare la ripetibilità delle misure.

La degradazione del film polifenolico ad opera del radicale $\text{OH}\cdot$ generato attraverso la fotolisi dell' H_2O_2 (10 mM) è stata studiata in funzione del tempo.

L'elettrodo modificato è stato inserito all'interno del reattore di quarzo in modo che l'irraggiamento fosse il più ripetibile possibile, impiegando 120 ml di una soluzione 10 mM di H_2O_2 . Al tempo di esposizione t la lampada è stata spenta, l'elettrodo è stato estratto dal reattore e posto nella cella elettrochimica e il segnale del $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ è stato registrato in voltammetria ciclica nelle condizioni CV1; l'elettrodo è stato poi reinserto nel reattore, e la lampada è stata riaccesa per effettuare le prove a tempi di esposizione maggiori. Si suppone che a lampada spenta, durante l'acquisizione del segnale, la variazione di concentrazione delle specie presenti sia trascurabile. La degradazione in funzione del tempo, per la prova del bianco, eseguita in doppio, in presenza solo di H_2O_2 , mostrata in figura 5.10, mette in evidenza una buona riproducibilità del segnale e della generazione dei radicali idrossilici:

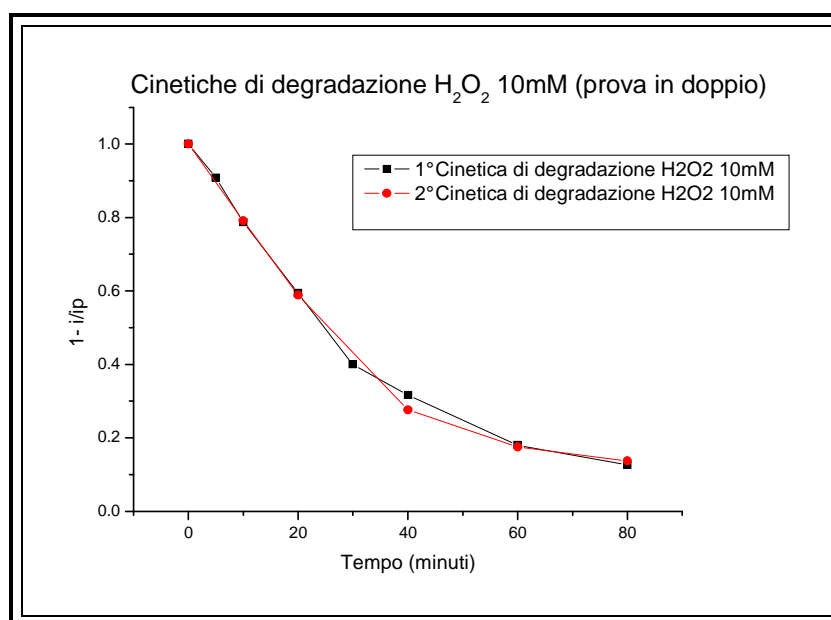


Figura 5.10. Cinetiche di degradazione del film polifenolico, ottenute fotolizzando una soluzione di H_2O_2 10 mM.

5.6.4) Determinazione del potere antiossidante dei composti di riferimento.

La degradazione del polimero polifenolico è stata condotta con fotolisi dell'acqua ossigenata ($[H_2O_2] = 10 \text{ mM}$) in presenza di diverse concentrazioni di antiossidante.

Le rette di calibrazione sono state ottenute sottoponendo il film polimerico per i seguenti tempi di esposizione all'azione radicalica: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minuti. La figura 5.11 mostra le cinetiche di degradazione relative all'acido ascorbico:

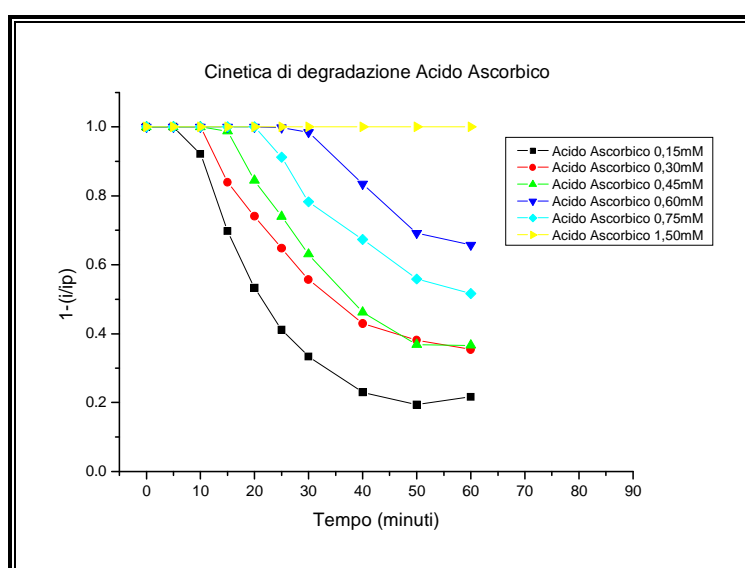


Figura 5.11. Cinetiche di degradazione ottenute in presenza di (L)-acido ascorbico a diverse concentrazioni.

Considerando i vari metodi analitici proposti in letteratura, la capacità antiossidante può essere quantificata attraverso rette di calibrazione, in cui il valore della variabile dipendente, da correlare linearmente alla concentrazione di antiossidante, può essere calcolata sulla base di 3 possibili differenti espressioni:

- **Lag Phase o Lag Time:** ovvero il tempo di ritardo con cui l'antiossidante rallenta ed inibisce l'attacco dei radicali idrossilici, agendo nella modalità di "chain breaking" e permettendo così al film polimerico una resistenza più duratura all'esposizione radicalica; la lag phase continua fino a che l'antiossidante non è stato totalmente "sacrificato". Una volta che ciò si è verificato, l'entità della degradazione del film cresce notevolmente fino a raggiungere velocità paragonabili a quelle in condizioni di mancata inibizione (figura 5.12).

Tale parametro quindi, che può essere visto come una sorta di “tempo di protezione”, può essere correlato in modo lineare alla concentrazione di antiossidante.

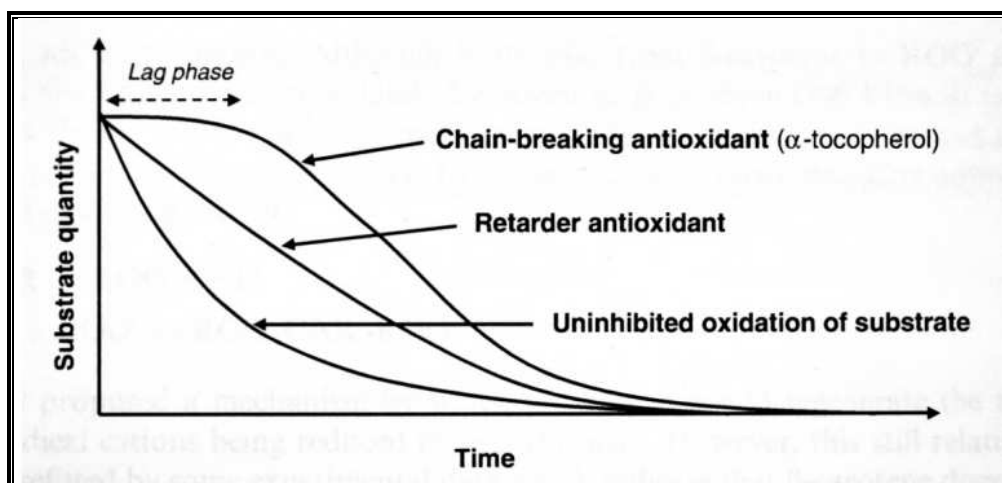


Figura 5.12. Concetto e rappresentazione di lag phase o lag time [4].

Una possibile limitazione all'uso della lag phase come parametro per ottenere la retta di calibrazione, è legato al fatto che, gli antiossidanti agenti nella modalità di chain breaking, come la classe dei tocoferoli, hanno elevati valori di lag phase, mentre altri composti che invece operano come ritardanti, presentano valori di lag phase molto ridotti.

Quindi la lag phase è un parametro che molto spesso dipende dalla modalità con cui l'antiossidante interviene nell'inibire la specie radicalica; nonostante questo la lag phase viene utilizzata come parametro quantitativo, nel TRAP, che è uno dei metodi standardizzati più comunemente adottato. Il Trolox[®], che appartiene alla classe dei tocoferoli, avendo struttura analoga alla vitamina E, presenta ottimi valori di lag phase, confermandosi quindi un ottimo antiossidante nella modalità di chain breaking.

Il calcolo della lag phase, a titolo di esempio per la soluzione 0.60 mM di acido ascorbico, viene mostrato in figura 5.13; una volta ottenuta l'equazione della retta, è sufficiente uguagliare questa ad 1.

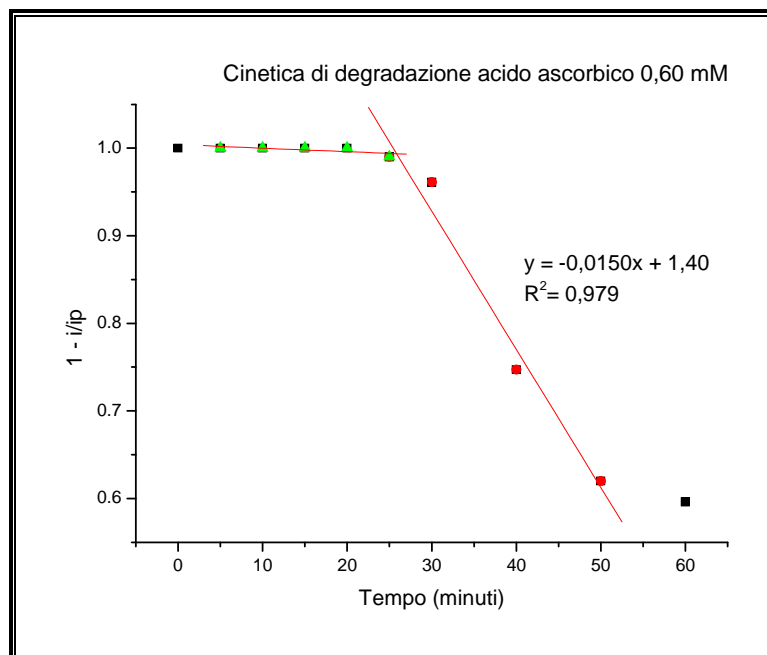


Figura 5.13. Modalità di calcolo del parametro della lag phase dalla cinetica di degradazione del film polifenolico.

I valori di lag phase così valutati a diverse concentrazioni sono stati utilizzati per costruire delle rette di taratura. In figura 5.14 e 5.15, sono riportate rispettivamente, le rette di taratura registrate per il Trolox® e l'acido ascorbico, utilizzando il parametro lag phase.

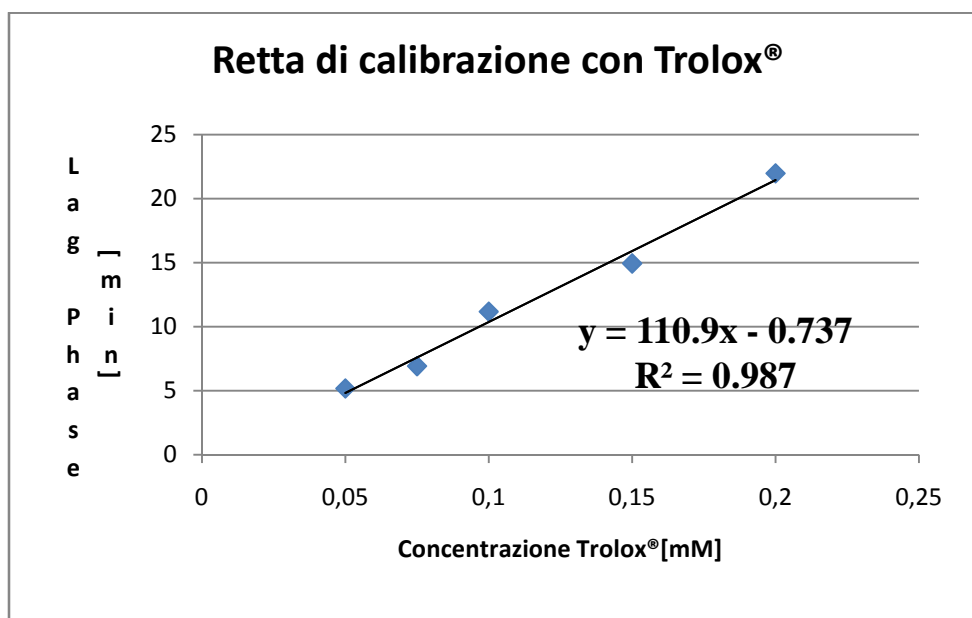


Figura 5.14. Retta di calibrazione del Trolox® usando il parametro lag phase.

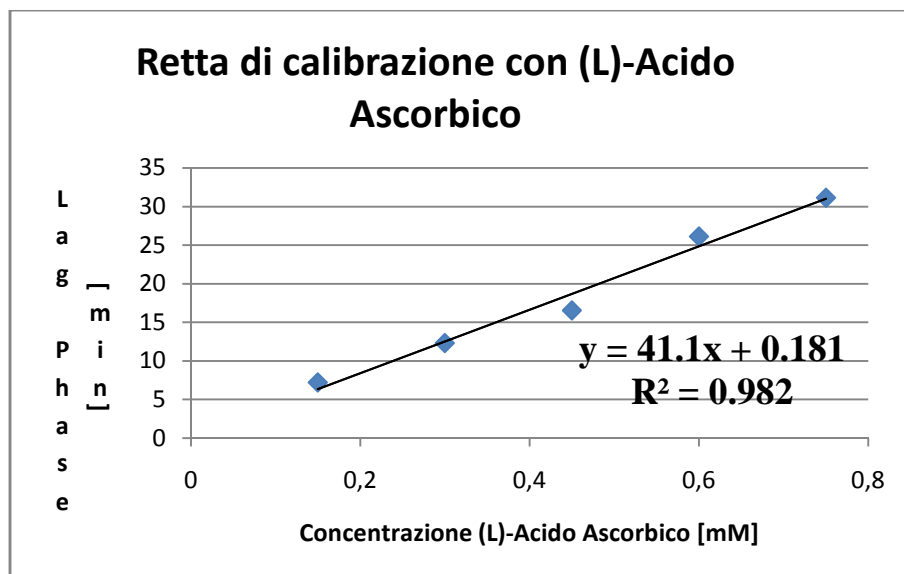


Figura 5.15. Retta di calibrazione dell'(L)-acido ascorbico usando il parametro lag phase.

- **Potere inibitore valutato ad un tempo t di 30 minuti:** si è valutata la % di inibizione alla degradazione del film da parte dell'antiossidante, utilizzando la seguente formula:

$$P. I. = \frac{\% \text{ degradazione}_{\text{pal bianco}} - \% \text{ degradazione}_{\text{antiossidante}}}{\% \text{ degradazione}_{\text{pal bianco}}}$$

Le rette di risposta per i composti puri sono state costruite graficando il P.I. in funzione della concentrazione di standard.

- **Integrale dell'area sottesa dalla curva di degradazione:** analogamente alla lag phase, l'area sottesa dalla curva di degradazione è indice del potere antiossidante: maggiore è l'area, maggiore risulta la protezione esercitata dalla molecola studiata. L'integrale è calcolato mediante il metodo dei trapezi, suddividendo l'area totale in 9 trapezi e sommando le rispettive aree.

Il confronto tra i vari indici AOC dei composti antiossidanti presi in considerazione, viene effettuato sulla base delle pendenze delle rette calibrazione ottenute graficando l'integrale ottenuto in funzione della concentrazione: più il valore della pendenza risulta essere elevato, maggiore sarà la capacità antiossidante della molecola, dal momento che servirà una concentrazione inferiore per raggiungere una data variazione del segnale strumentale.

Una volta trovato il parametro più funzionale per ricavare le rette di calibrazione, per ogni composto puro studiato, si calcola l'indice TEAC (Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity),

che si ottiene dal rapporto tra la pendenza della retta di calibrazione del composto analizzato e la pendenza della retta di calibrazione del Trolox[®], impiegato come standard di confronto.

In questo modo, si può stilare la classifica della capacità antiossidante dei vari composti, in termini di Trolox[®] equivalente.

Il concetto di Trolox[®] equivalente, deriva come definizione, dai saggi ORAC e ABTS, e corrisponde alla concentrazione millimolare di una soluzione di Trolox[®] che presenta la stessa capacità antiossidante di una soluzione 1.0 mM del composto puro o della miscela da analizzare.

Il TEAC si calcola con l'espressione che segue:

$$\text{TEAC} = \frac{m(\text{campione})}{m(\text{Trolox}^{\text{®}})}$$

in cui $m(\text{campione})$ e $m(\text{Trolox}^{\text{®}})$ sono rispettivamente le pendenze delle rette di calibrazione ottenute per il campione e il Trolox[®].

L'incertezza associata al parametro TEAC, indicata con la lettera σ , viene calcolata con la seguente equazione di propagazione dell'errore:

$$\text{Errore \%} = \sqrt{\left(\frac{s_{\text{Trolox}}}{m_{\text{Trolox}}}\right)^2 + \left(\frac{s_{\text{campione}}}{m_{\text{campione}}}\right)^2}$$

$$\sigma = \text{TEAC} * \text{Errore \%}$$

in cui s_{Trolox} e s_{campione} sono rispettivamente le incertezze associate alla pendenza m della retta di calibrazione del Trolox[®] e del campione.

In alcuni articoli più recenti [52], è stato introdotto anche il parametro VCEAC, acronimo di Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity, che permette di classificare il valore della capacità antiossidante di un campione, esprimendolo come acido ascorbico equivalente, poichè è un composto più conosciuto e noto rispetto al Trolox[®] che è di origine sintetica.

Il parametro VCEAC, in analogia al TEAC, si ricava dal rapporto tra la pendenza della retta di calibrazione del composto in esame e la pendenza della retta di calibrazione dell'acido ascorbico.

$$\text{VCEAC} = \frac{m(\text{campione})}{m(\text{Acido ascorbico})}$$

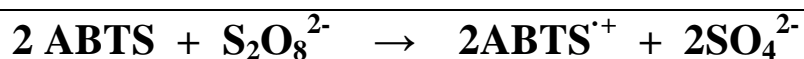
5.7) Determinazione del potere antiossidante con metodi standardizzati

I risultati del metodo elettrochimico relativi al trend della capacità antiossidante, sono stati confrontati e correlati con quelli ottenuti da metodiche analitiche standardizzate ed ampiamente impiegate sia a livello di ricerca che a livello di controllo qualità.

Vengono di seguito riportate tali metodiche analitiche utilizzate con la rispettiva procedura operativa.

5.7.1) Saggio ABTS.

La metodica più ampiamente citata ed impiegata in letteratura per l'applicazione del saggio ABTS, è quella di Re et al.[31], in cui si genera la soluzione radicalica a base di $\text{ABTS}^{\cdot+}$, in tampone fosfato a pH 7.4, sfruttando come agente ossidante il persolfato di sodio e di potassio, secondo la seguente reazione:



La soluzione non deve presentare del persolfato in eccesso, perchè, essendo tale specie un forte agente ossidante, potrebbe lui stesso reagire con l'antiossidante, inficiando così l'accuratezza dell'analisi. Questa reazione di generazione del composto radicalico è molto lenta; infatti richiede un periodo di circa 16÷18 ore, al buio, per arrivare a completezza ed presentare così un valore di assorbanza che sia stabile nel tempo.

Il composto non radicalico, ovvero ABTS-H, si presenta quasi incolore ed è caratterizzato da una debolissima assorbanza nel visibile, come si può notare dallo spettro di assorbimento il suo spettro di assorbimento riportato in figura 5.16 relativo al range del Visibile; la figura mostra infatti un massimo intorno a 380 nm e poi il valore dell'assorbanza è tendente a zero per tutto l'intervallo di lunghezze d'onda del range del visibile.

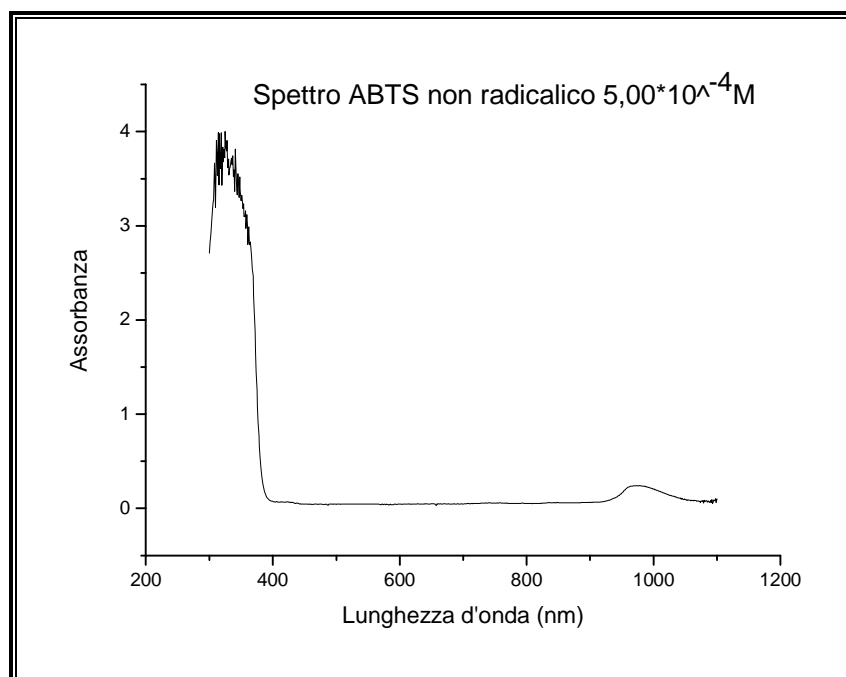


Figura 5.16. Spettro di assorbimento dell'ABTS non radicalico $5.00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Nella sua forma radicalica, tale composto assume una intensa colorazione blu-verde, con un coefficiente di estinzione molare ϵ alla lunghezza d'onda di 732 nm, intorno a $1.5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ [31] (figura 5.17).

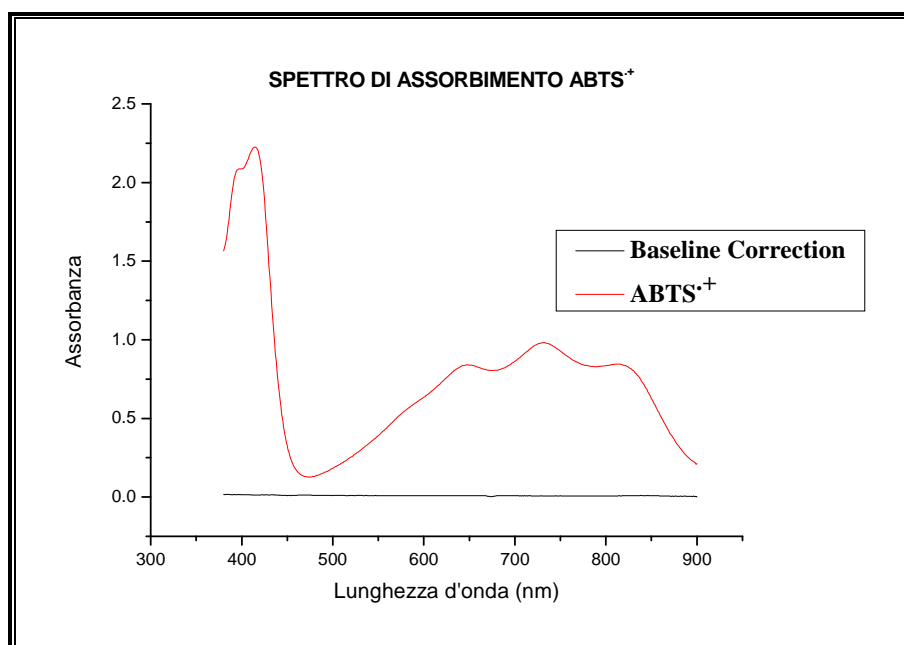


Figura 5.17. Spettro di assorbimento della forma radicalica $\text{ABTS}^{\cdot+}$ $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Benchè il coefficiente di estinzione molare sia più elevato a 400 nm si preferisce condurre il saggio alla lunghezza d'onda di 732 nm poiché a questa lunghezza d'onda sono minori le possibili specie interferenti. Tra queste, ci può essere anche il composto ABTS-H non radicalico, il quale presenta il massimo di assorbimento proprio intorno alla lunghezza d'onda di 400 nm.

Nonostante il lavoro originale di Re et al.[31], proponga di operare in tampone fosfato pH 7.4 per simulare l'ambiente fisiologico in vivo, è stato notato in articoli più recenti, che a tale valore di pH il composto radicalico non è molto stabile e nel tempo può perdere il suo valore originario di assorbanza, rendendo più complicata l'applicazione di tale test. Per tale ragione si è deciso di lavorare a pH 4.5, ottenuto con tampone acetato, in accordo col lavoro di Ozgen et al.[47].

Si prepara una soluzione madre di ABTS non radicalico $5.00 \cdot 10^{-4} \text{M}$, in tampone acetato 50 mM, tramite micropipetta vengono sottratti 500 μl di soluzione, aggiungendone poi altrettanti, di una soluzione $2.5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ di $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ per permettere una completa ossidazione del composto radicalico, dal momento che le due specie si trovano in rapporto stechiometrico.

Dopo aver aspettato 16÷18h per il raggiungimento della completezza della reazione, mantenendo la soluzione al buio, si misura l'assorbanza della soluzione, controllando che tale valore si mantenga stabile nel tempo. La soluzione madre della specie radicalica $\text{ABTS}^{\cdot+}$ così ottenuta, è stata diluita, prelevando con pipetta tarata 15ml e portandoli a volume in un matraccio da 50 ml, con la soluzione 50 mM di tampone acetato, in modo tale da avere valori di $A_{732\text{nm}}$ intorno all'unità.

Benchè l'articolo di Re et al.[31], suggerisca di non ossidare completamente l'ABTS non radicalico, e, quindi che di aggiungere il persolfato in difetto stechiometrico, si è notato con prove preliminari, come l'assorbanza della soluzione fosse più stabile nel tempo facendo, ossidare completamente l'ABTS non radicalico.

Tutte le cinetiche sono state condotte in triplo, (lunghezza d'onda = 732 nm) , facendo reagire in cuvetta di quarzo, 2 ml della soluzione $1.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ di $\text{ABTS}^{\cdot+}$ con 100 μl della soluzione di antiossidante o di campione, per una durata di 20 minuti. Un esempio della cinetica di decolorazione dell' $\text{ABTS}^{\cdot+}$, per diverse tipologie di antiossidanti, tratta dal lavoro originale di Re et al.[31], viene indicata in figura 5.18:

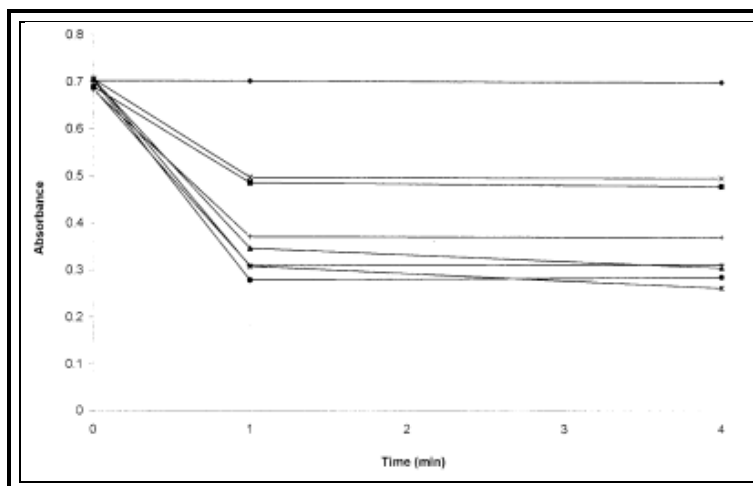


Figura 5.18. Esempio dell'andamento della decolorazione del composto ABTS^+ nel tempo, in presenza di antiossidanti [31].

Il parametro con cui costruire la retta di calibrazione nel saggio ABTS, corrisponde al decremento dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 732 nm, dopo 20 minuti di reazione.

L'equazione impiegata è la seguente:

$$\text{Decremento } A_{732\text{nm}} (20 \text{ minuti}) = 1 - \frac{A_{\text{campione}} (732\text{nm})}{A_{\text{bianco}} (732\text{nm})}$$

dove:

$A_{\text{campione}(732\text{nm})}$ = assorbanza misurata dopo 20 minuti dalla aggiunta del campione o dello standard, alla lunghezza d'onda di lavoro;

$A_{\text{bianco}(732\text{nm})}$ = assorbanza misurata dopo 20 minuti per la soluzione di ABTS^+ , alla lunghezza d'onda di lavoro di 732 nm.

5.7.2) Saggio DPPH.

Il saggio spettrofotometrico DPPH, è stato svolto secondo le modalità descritte da Brand-Williams et al[34,35]. Prima di ogni analisi cinetica di campioni o composti antiossidanti, si realizza una retta di calibrazione con soluzioni metanoliche di DPPH 10, 30, 45, 60 e 90 μM . Le prove cinetiche vengono poi effettuate con una soluzione 65 μM di DPPH, con $A_{516\text{nm}}$ intorno a 0.7, ottenuta per diluizione di una soluzione madre 0.5 mM.

La retta di calibrazione, permette di monitorare, con il decorrere della reazione, la concentrazione della specie radicalica residua, dopo averla fatta reagire con le specie antiossidanti o col campione.

In cuvetta si pongono 3.0 ml della soluzione di DPPH \cdot 65 μ M e 80 μ l della soluzione dell'antiossidante da investigare, monitorando l'andamento dell'assorbanza alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento ($\lambda = 516\text{nm}$), per una durata complessiva di 30 minuti.

Come già detto nel capitolo 2, il radicale DPPH \cdot di intensa colorazione viola, acquistando un atomo di idrogeno da un composto antiossidante, passa ad una colorazione giallo pallida, con una conseguente forte diminuzione di assorbanza alla lunghezza d'onda di lavoro.

La capacità antiossidante viene tradizionalmente espressa come EC₅₀ (Efficient Concentration), ovvero la concentrazione effettiva di antiossidante in grado di determinare un decremento dell'assorbanza originaria del 50% [34,35].

Il parametro EC₅₀, si calcola dalla retta di calibrazione ottenuta per il campione o composto puro, diagrammando il valore % della concentrazione rimanente di DPPH \cdot (DPPH% rem), dopo i 30 minuti di reazione, in funzione della concentrazione.

Il parametro DPPH% rem, è calcolato nel seguente modo:

$$\% \text{DPPH rem} = \frac{[\text{DPPH}\cdot](t=30\text{minuti})}{[\text{DPPH}\cdot](t=0\text{ minuti})}$$

Ovviamente, più sono bassi i valori del parametro EC₅₀ e più è efficace la capacità antiossidante, in quanto serve una quantità minore del composto per determinare la stessa diminuzione della concentrazione di DPPH \cdot .

Sanchez–Moreno et al.[49], hanno espresso nel loro articolo di letteratura il parametro T_{EC50}, ovvero il tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario dell'assorbanza, ad una concentrazione pari a quella dell'EC₅₀, da cui poi poter risalire al valore di “Efficienza Antiradicalica” AE, espressa secondo l'equazione sottoriportata:

$$\text{AE} = \frac{1}{(\text{EC}_{50} * \text{TEC}_{50})}$$

Il valore del T_{EC50} non è stato da noi calcolato, dal momento che per diversi composti antiossidanti, caratterizzati da una cinetica di reazione molto lenta, il raggiungimento dello stato stazionario avviene a tempi di gran lunga superiori ai 30 minuti [34,35].

Si può poi calcolare anche il coefficiente stechiometrico n, che corrisponde al numero di molecole di radicale DPPH \cdot , che vengono ridotte da parte di una singola molecola di antiossidante, con la seguente equazione:

$$n = (A_{\text{finale}} - A_{\text{iniziale}}) / (\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} \cdot C \cdot l)$$

5.7.3)ORAC

Il saggio ORAC, è stato condotto secondo le specifiche e modalità di esecuzione riportate nel lavoro di Ou et al.[27], utilizzando la fluoresceina come sorgente del segnale di fluorescenza.

Tutte le soluzioni impiegate sono state realizzate in tampone fosfato 75 mM al valore del pH fisiologico 7.4; la soluzione di fluoresceina è stata preparata alla concentrazione di 96 nM e quella del generatore radicalico AAPH alla concentrazione di 133 mM.

Inizialmente si sono registrati lo spettro di eccitazione e quello di emissione della soluzione di Fluoresceina 96 nM in tampone fosfato 75 mM a pH 7.4 (figura 5.19).

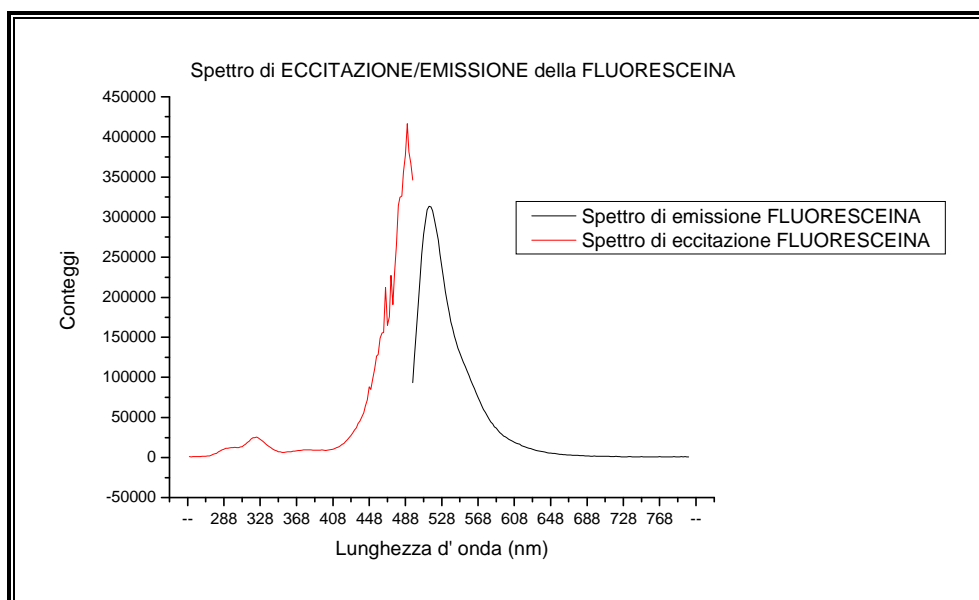


Figura5.19. Spettri di eccitazione ed emissione della fluoresceina.

Lo spettro mette in evidenza che il massimo di eccitazione si verifica a 486 nm ed il massimo di intensità di radiazione emessa, espressa come il numero di conteggi, si ha a 517nm.

Per tale motivo si è deciso operativamente di tagliare tutte le radiazioni provenienti dalla lampada allo Xe a lunghezza d'onda superiore a 495 nm, eccitare il campione a 486 nm e registrare lo spettro di emissione della fluoresceina nel range compreso tra i 500 e 705 nm.

Dopo aver termostatato l'alloggiamento della cella di misura, alla temperatura di 37°C, in modo tale da permettere la generazione dei radicali alchil perossidici per decomposizione termica dell'AAPH, si effettuano le seguenti aggiunte in cuvetta (figura 5.20):

- 200 µl di campione o standard ;
- 1500 µl di Fluoresceina 96 nM ;
- 300µl di AAPH 133 mM.

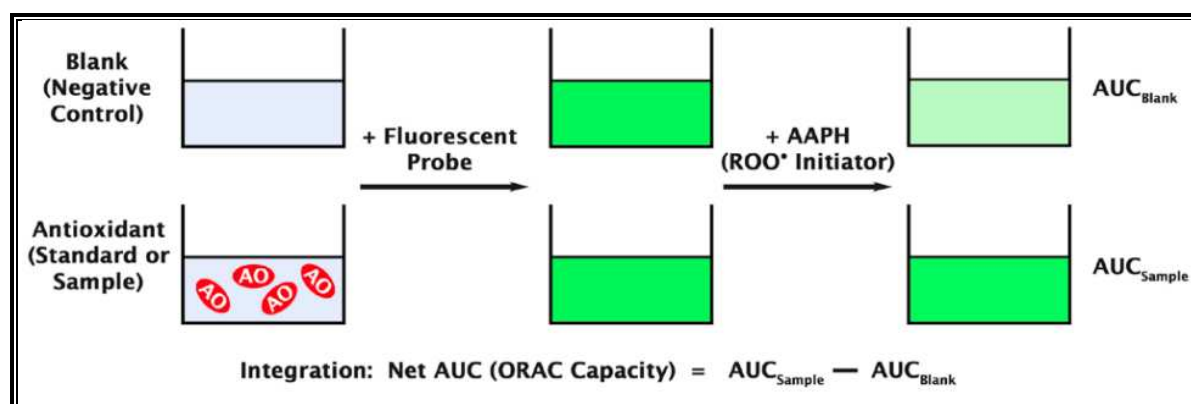


Figura 5.20. Modalità di esecuzione del saggio ORAC, tratto da[51].

Al termine delle varie aggiunte, viene poi monitorato nel tempo il segnale relativo allo spegnimento o quenching dell'intensità di emissione fluorescente, causato dall'attacco radicalico sulla fluoresceina. Ad ogni minuto, considerando un tempo aggiuntivo (dwell time) di 0,43 minuti tra una misura e l'altra, per l'ottenimento dell'intero spettro di emissione tra 500 e 705 nm, si monitora il segnale di fluorescenza emessa. In figura 5.21, si riportano i vari spettri di emissione della fluoresceina in presenza di Trolox® 10 µM nel tempo. Si può notare che la presenza dell'antiossidante, per un determinato periodo di tempo, mantiene quasi costante l'emissione di fluorescenza, mentre dopo che è avvenuta la degradazione per la presenza dei radicali alchilperossidici ROO•, si riscontra un rapido ed esponenziale spegnimento/decadimento dell'intensità di radiazione emessa.

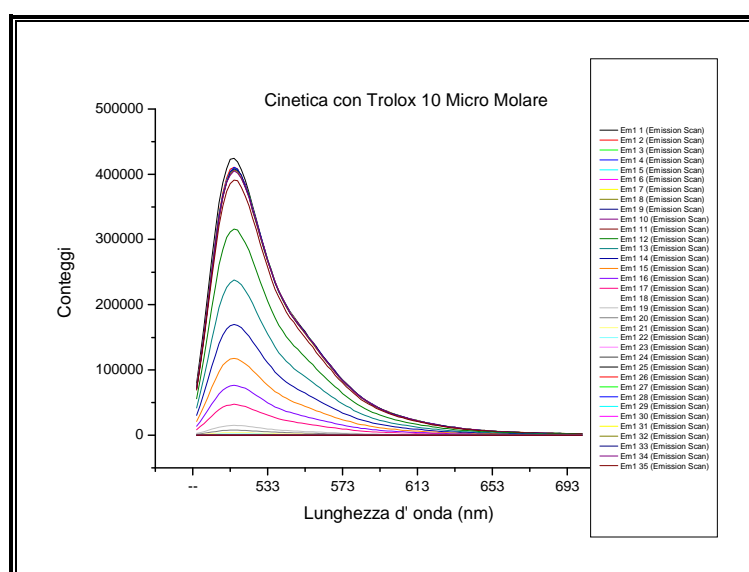


Figura 5.21. Cinetica di decadimento della Fluorescenza 96nM in presenza di Trolox® 10Mm e AAPH 133mM.

(il segnale dall'altro verso il basso rappresenta scansioni successive dalla n°1 fino alla n°35)

Riportando l'andamento dell'intensità di fluorescenza relativa, valutata alla lunghezza d'onda a cui si ha il massimo di emissione, in funzione del tempo, si ottengono delle curve di decadimento della fluorescenza, riportate in figura 5.22 e tratte dal lavoro originale di Ou et al.[27]:

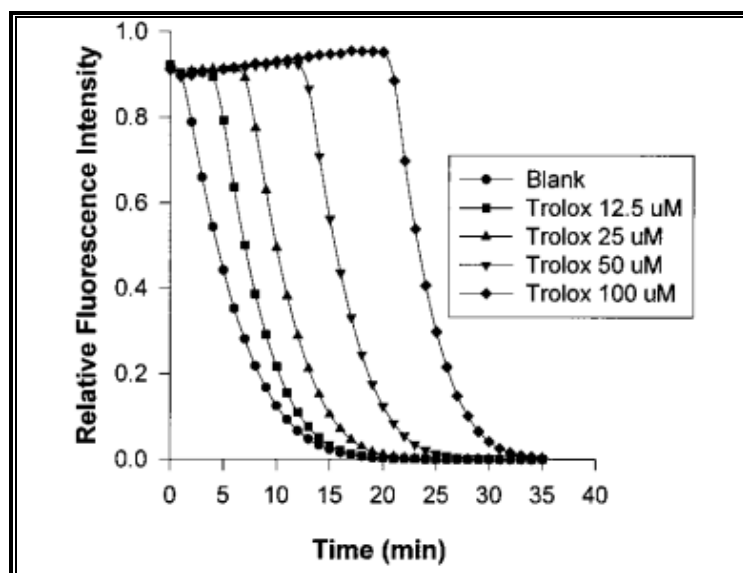


Figura 5.22. Saggio ORAC a diverse concentrazioni di Trolox®, tratto dal lavoro originale di Ou et al.[27].

Il segnale utilizzato per valutare il potere antiossidante è l'area sottesa dalla curva (AUC) calcolato secondo la seguente equazione:

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + + f_n/f_0$$

dove $f_0, f_1, f_2, f_3, \dots, f_n$, sono i valori di intensità di emissione fluorescente misurati a diversi tempi della cinetica.

Dal valore di AUC, si può poi esprimere il valore dell'indice ORAC, nella seguente modalità:

$$Indice\ ORAC = \frac{[(AUC\ campione - AUC\ bianco)]}{[(AUC\ Trolox^{\circledR} - AUC\ bianco)]} * \frac{(molarità\ Trolox^{\circledR})}{(molarità\ campione)}$$

Il saggio ORAC è stato eseguito per tutti i 5 composti antiossidanti investigati.

5.7.4) Metodo di Folin-Ciocalteu

Il metodo di Folin-Ciocalteu per la determinazione del contenuto totale dei polifenoli è stato svolto secondo le modalità e variazioni suggerite dagli articoli di Singleton e Rossi[37,38].

In matracci tarati da 20 ml sono state effettuate le seguenti aggiunte nell'ordine sotto indicato:

- 2 ml della soluzione di standard o campione diluito da analizzare;
- 10 ml del reattivo di Folin-Ciocalteu (F-C), diluito in rapporto 1:10 con H₂O distillata;
- soluzione 75g/L di Na₂CO₃ (pH>11), fino al volume di 20 ml.

Le soluzioni così preparate, sono state vigorosamente agitate per circa un minuto, aspettando successivamente un periodo di 2 ore al buio alla temperatura di 25°C, affinché possa decorrere completamente la reazione e l'assorbanza raggiunga un valore stabile.

Al termine della reazione tra il reattivo di Folin-Ciocalteu e i vari substrati ossidabili, si effettua la quantificazione per via spettrofotometrica, lavorando alla lunghezza di lavoro di 765 nm.

Inizialmente è stato eseguito uno spettro di assorbimento del reattivo F-C nel range del visibile, per vedere che il reattivo F-C non presenti un qualche assorbimento alla lunghezza d'onda di lavoro:

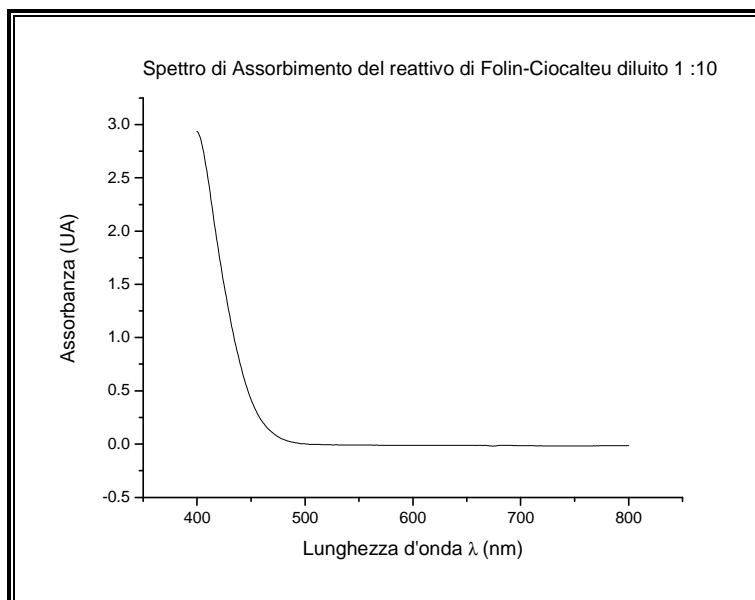


Figura 5.23. Spettro di assorbimento del reattivo F-C diluito 1:10.

Come si nota dalla figura 5.23, alla lunghezza di lavoro (765nm), il reattivo non manifesta alcuna interferenza, dal momento che presenta un valore di assorbanza tendente a zero. E' stata poi costruita una retta di calibrazione impiegando come standard l'acido gallico, composto che nell'articolo di Singleton viene impiegato per esprimere il contenuto totale di polifenoli, valutato in termini di acido gallico equivalenti (Gallic Acid Equivalents o GAE), [. In analogia al parametro TEAC e VCEAC, il valore del GAE, si calcola dal rapporto tra il coefficiente angolare della retta di calibrazione ottenuta col campione in esame e quello ottenuto dalla retta di calibrazione con acido gallico:

$$\text{GAE} = \frac{m(\text{campione})}{m(\text{acido gallico})}$$

5.7.5)Approccio Potenzimetrico.

Le misure potenziometriche sono state eseguite nel seguente modo: in un becher sono stati versati 10 ml di una soluzione $1.00 \cdot 10^{-3}$ M di $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e una uguale aliquota di una soluzione $1.00 \cdot 10^{-4}$ M di $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, entrambe preparate in tampone fosfato 0.1 M a pH 7.4.

In seguito ad aggiunte di 1000 μL di soluzione di antiossidante, si è monitorato il potenziale di un elettrodo indicatore, costituito da un filo di Pt, rispetto a un elettrodo di riferimento al calomelano saturo. Il potenziale della soluzione varia in seguito alla variazione del rapporto tra $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$, in modo analogo a quando si esegue una titolazione.

Quando tutto il ferricianuro, che agisce in qualità di agente ossidante, viene ridotto a ferrocianuro; il viraggio della soluzione dal giallo all'incoloro, permette anche visivamente di cogliere il punto finale.

Le curve di della variazione del potenziale della soluzione, in seguito alle aggiunte di soluzione o miscela antiossidante, sono state poi trattate matematicamente in derivata prima e derivata seconda, al fine di cogliere nel modo più accurato possibile il punto di fine titolazione (figure 5.24, 5.25 e 5,26).

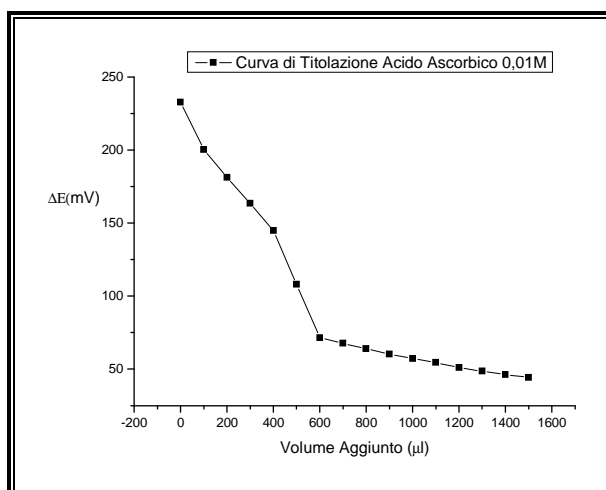


Figura 5.24. Curva registrata aggiungendo alla soluzione contenente gli ioni ferro e ferricianuro aliquote note di (L)-acido ascorbico 0,01M.

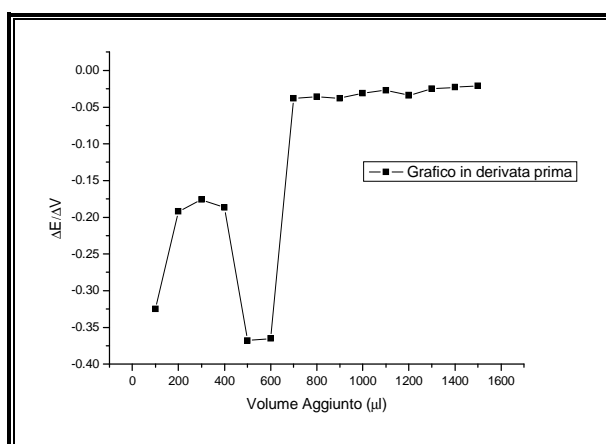


Figura 5.25. Derivata prima della figura 5.24.

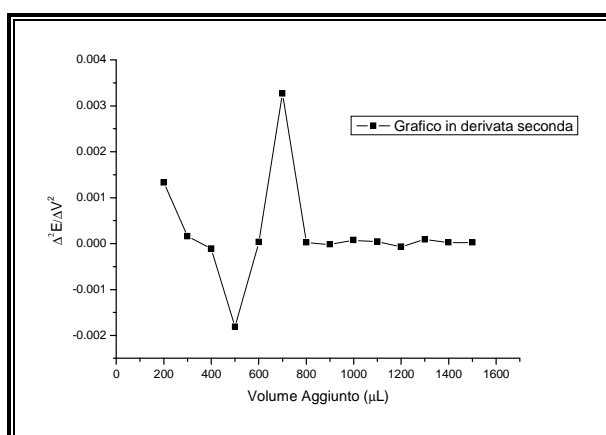


Figura 5.26. Derivata seconda della figura 5.24.

Dal valore del punto finale, si può poi risalire al numero di equivalenti di antiossidante utilizzati per titolare gli ioni ferricianuro presenti inizialmente in soluzione; riportando poi la variazione di potenziale ΔE (mV) in funzione dei microequivalenti aggiunti di composto antiossidante, si ottengono delle curve di risposta, la cui pendenza è un indice per valutare la capacità antiossidante e stilare una classifica del parametro AOC.

Un altro parametro utile per classificare i vari antiossidanti, è quello riportato dall'autore di tale pubblicazione [39] sotto il nome di AOA (Anti Oxidant Activity), la cui espressione di calcolo è indicata nel paragrafo 2.7.

5.8) Determinazione della capacità antiossidante di un campione reale.

5.8.1) Descrizione del campione reale.

Una volta testata la capacità antiossidante dei singoli composti puri, si è esteso il metodo elettrochimico all'analisi di un campione reale, costituito da un succo di frutta a base di purea di mirtillo, uva rossa e mela, prodotto dalla ditta Yoga®, sotto il nome di “Antiossidante Quotidiano Viola”, nello stabilimento di Barbiano di Cotignola (Ra).

Il campione reale è stato analizzato anche coi metodi analitici standardizzati, al fine di confrontare i parametri TEAC e VCEAC che ne derivano.

L'etichetta presente nel contenitore di succo, riporta le seguenti caratteristiche composizionali elencate in tabella 5.1; il valore del pH poichè non era disponibile, è stato misurato, eseguendo 3 ripetizioni, ed è stato espresso come media \pm SD:

Parametro	Valore
pH	3.21 \pm 0,01
Contenuto di Vitamina C	400 [mg / l]
Contenuto di Vitamina E	30 [mg / l]
PoliFenoli Totali	800 [mg / l]

Tabella 5.1. Parametri del campione reale analizzato.

5.8.2) Descrizione del trattamento del campione.

Poichè il campione di succo di frutta, si presentava sotto forma di sospensione, esso è stato filtrato sotto vuoto, mediante tubo di Venturi, attraverso filtro di nylon con pori aventi diametro medio di 0.45µm, in modo tale da ottenere una soluzione trasparente.

La fase di filtrazione è stata molto delicata perchè la presenza di particelle in sospensione può inficiare il dato analitico finale, soprattutto per le misure spettrofotometriche e spettrofluorimetriche, a causav di fenomeni di scattering della radiazione incidente.

Al termine della filtrazione, il campione di succo di frutta è stato subito conservato in frigo sotto atmosfera di azoto, al fine di evitare contaminazioni e preservare i composti antiossidanti presenti.

5.8.3) Descrizione del tipo di prove effettuate.

Tutte le tecniche sopracitate (metodo elettrochimico, ABTS, DPPH, ORAC, Metodo di Folin-Ciocalteu), esclusa quella relativa all'approccio Potenzimetrico, sono state applicate per la determinazione del parametro AOC , espresso sempre in termini di Trolox® equivalente, per il campione reale (o in termini di GAE per il metodo di Folin-Ciocalteu).

In base ai divesi metodi impiegati per determinarne il parametro AOC, sono stati eseguiti opportuni rapporti di diluizione del campione in acqua distillata.

CAPITOLO 6

RISULTATI E DISCUSSIONE.

6.1) Metodo elettrochimico.

Vengono di seguito riportate tutte le cinetiche di degradazione effettuate e svolte per i 5 antiossidanti, col metodo elettrochimico.

Verrà successivamente fatto un confronto tra le 3 modalità con cui poter esprimere la retta di calibrazione per ogni composto testato.

6.1.1) Cinetiche di degradazione.

Nelle figure 6.1-6.5 vengono riportate le curve relative alle cinetiche di degradazione dei 5 composti presi in esame, in cui viene graficato l'andamento della superficie elettrodica coperta dal polimero (Cop) in funzione del tempo di esposizione alla lampada UV. In ogni cinetica di degradazione, in presenza di antiossidante, possiamo osservare due fasi ben distinte: una prima fase in cui non si ha degradazione e il valore di Cop rimane costante con valore di uno. L'effetto di rimozione del radicale $\text{OH}\cdot$ da parte dei vari antiossidanti è così efficace che la concentrazione di radicali $\text{OH}\cdot$ è talmente bassa da non poter attaccare il film. La lunghezza di questa fase dipenderà dalla concentrazione della specie in soluzione e dalla sua velocità di reazione con i radicali $\text{OH}\cdot$. Infatti in assenza di antiossidante, non si osserva nessuna fase di induzione. Nella seconda fase, i composti antiossidanti sono stati consumati, di conseguenza la concentrazione dei radicali $\text{OH}\cdot$ in soluzione aumenta ed è così possibile che avvenga la degradazione del film polimerico. Il grado di copertura dell'elettrodo diminuirà con andamento di tipo esponenziale.

È possibile notare un certo grado di analogia e somiglianza con le curve cinetiche di decadimento del segnale di fluorescenza ottenute col saggio ORAC e TRAP, i metodi più adottati per la determinazione della capacità antiossidante.

Come già detto nella parte sperimentale, quando si hanno a disposizione le curve relative a cinetiche di degradazione, in letteratura i più comuni metodi di elaborazione del segnale sono: il tempo di induzione, l'area sottesa dalla curva e il potere inibente.

Vengono riportate di seguito nelle figure 6.1-6.5, le cinetiche di degradazione ottenute per i 5 composti antiossidanti investigati.

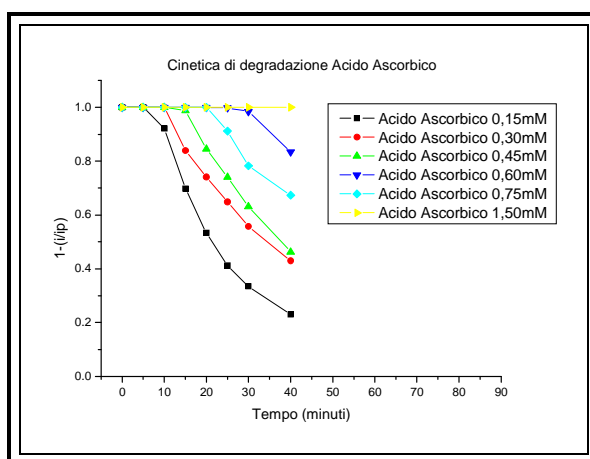


Figura 6.1 Cinetica di degradazione (L)-acido ascorbico, metodo elettrochimico.

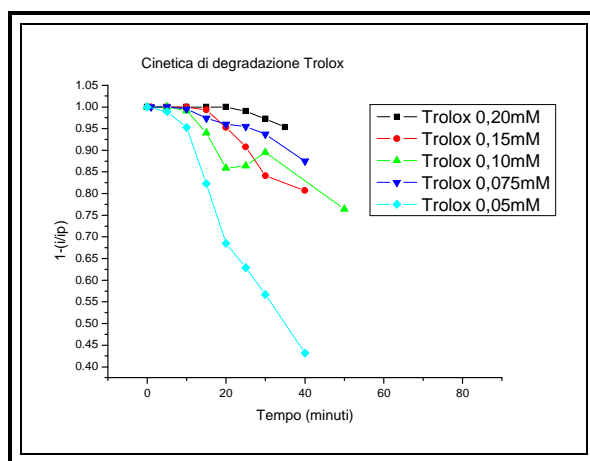


Figura 6.2 Cinetica di degradazione Trolox®, metodo elettrochimico.

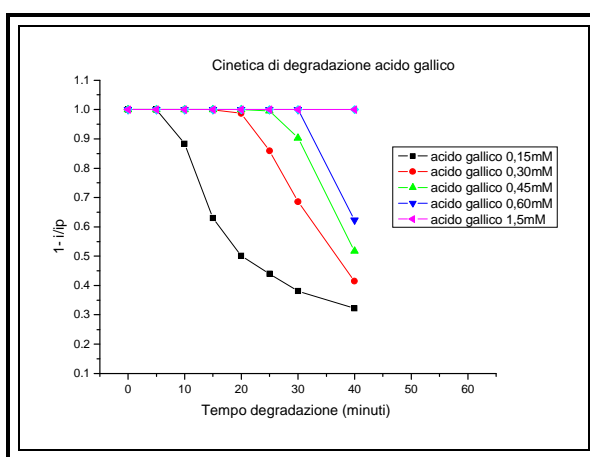


Figura 6.3 Cinetica di degradazione acido gallico, metodo elettrochimico.

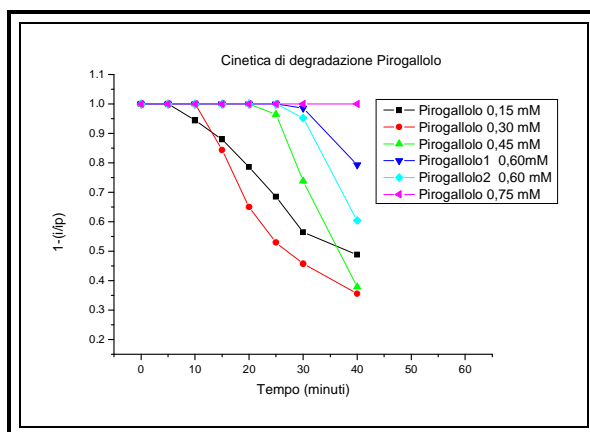


Figura 6.4 Cinetica di degradazione pirogallolo, metodo elettrochimico.

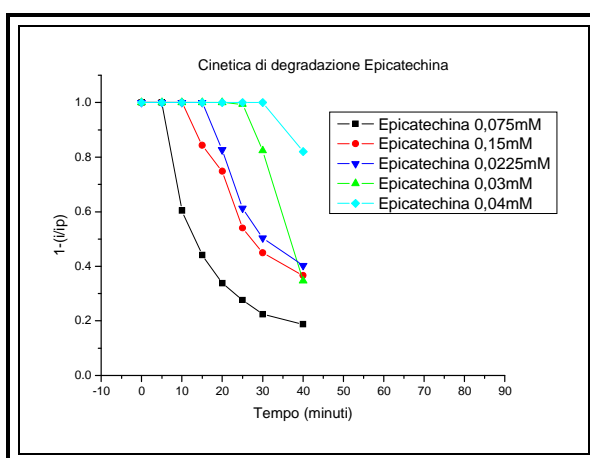


Figura 6.5 Cinetica di degradazione (-)-epicatechina, metodo elettrochimico.

6.1.2) Rette di calibrazione con integrale.

Viene di seguito indicata la tabella 6.1, che riassume i parametri delle rette di calibrazione dei 5 antiossidanti, ottenute utilizzando come parametro di quantificazione l'area sottesa dalla curva cinetica di degradazione, per un tempo di esposizione massimo alla lampada UV di 40 minuti. I bassi valori dei coefficienti di correlazione, in un caso anche inferiori a 0.9, sono dovuti sia ai pochi punti con cui è stata interpolata la curva di degradazione, sia alla scarsa ripetibilità dei dati dopo la fase di induzione.

Composto	$m + s_m$	$b + s_b$	R^2
Trolox	$110 + 30$	$2 + 3$	0.868
(L)-Acido ascorbico	$24 + 2$	$-4 + 1$	0.976

Acido gallico	26 + 2	-4 + 1	0.983
Pirogallolo	25 + 2	-1,7 + 0,6	0.992
(-)-Epicatechina	60 + 10	-8 + 2	0.929

Tabella 6.1. Parametri caratteristici delle rette di calibrazione utilizzando l'area sotto la curva..

6.1.3) Rette di calibrazione con potere inibente a 30 minuti.

In tabella 6.2 si riportano i dati delle rette di calibrazione per i composti antiossidanti, espresse in funzione del potere inibente a 30 minuti di esposizione alle radiazioni UV. Anche in questo caso non si osservano correlazioni ottimali:

Composto	$m \pm s_m$	$b \pm s_b$	R^2
Trolox	4,3 + 1,3	0 + 0,2	0.848
(L)-Acido ascorbico	1,7 \pm 0,3	-0,3 \pm 0,2	0.930
Acido gallico	1,9 \pm 0,5	-0,1 \pm 0,2	0.949
Pirogallolo	1,8 \pm 0,4	-0,2 \pm 0,2	0.979
(-)-Epicatechina	4,2 \pm 1,7	-0,6 \pm 0,4	0.858

Tabella 6.2 Parametri caratteristici delle rette di calibrazione utilizzando il potere inibente a 30 minuti.

6.1.4)Rette di calibrazione con Lag phase.

Utilizzando invece la lag phase, sono state ottenute le seguenti rette di calibrazione, riassunte nella tabella 6.3. E' possibile osservare che in questo caso si ottiene un'ottima correlazione di linearità, evidenziata da un elevato valore di R^2 .

Composto	$m \pm s_m$	$b \pm s_b$	R^2
Trolox	111 + 7	-0,7 + 0,9	0.987
(L)-Acido ascorbico	41 \pm 3	0 \pm 1	0.982
Acido gallico	41 \pm 3	-2 \pm 1	0.984

Pirogallolo*	56 ± 7	-4 ± 3	0.965
(-)-Epicatechina	94 ± 6	-2 ± 1	0.991

Tabella 6.3 Rette di calibrazione utilizzando la lag phase. * durante la prova effettuata si è verificato un mancato funzionamento della lampada che ha portato a dati anomali

6.1.5) Confronto tra i vari metodi (lag phase, integrale e potere inibente.

Dal confronto tra le diverse rette di calibrazione ottenute per gli antiossidanti testati in termini di coefficiente di correlazione e di deviazione standard associata alla pendenza, si può notare come il parametro lag phase permetta di ottenere i migliori risultati, mentre il potere inibente quelli peggiori.

Questi risultati sono forse da imputare all'andamento discontinuo e poco riproducibile delle cinetiche di degradazione che, probabilmente, sono molto dipendenti dalla morfologia, dallo spessore e dalla composizione del film polifenolico depositato.

Infatti le ultime prove effettuate ((-)-epicatechina, acido gallico e acido ascorbico) sono risultate più soddisfacenti grazie a un incremento della ripetibilità dei film, presumibilmente dovuto ad una maggiore manualità operativa.

Il fatto che il tempo di induzione risulti essere il parametro più ripetibile può essere spiegato nel seguente modo. L'inizio della degradazione non è probabilmente affetto dalle variabili morfologiche del film, ma dipende fortemente dalla concentrazione di radicale $\text{OH}\cdot$ generato in soluzione. Per tale motivo la quantificazione del valore AOC sul campione reale, la valutazione del trend della capacità antiossidante e le correlazioni con gli altri metodi, verrà eseguita esprimendo la variabile dipendente in termine di tempo di induzione..

6.1.6) Confronto tra i vari antiossidanti.

Una volta ottenute le diverse rette di calibrazione per i vari composti antiossidanti, si sono confrontati i vari valori di AOC, al fine di stabilire un trend di capacità antiossidante. Un confronto preliminare può essere fatto considerando il valore della lag phase ad un preciso valore di concentrazione. Ovviamente la capacità antiossidante aumenta quanto più è elevata la lag phase, a parità di concentrazione.

La figura 6.6, riporta le diverse cinetiche di degradazione dei vari antiossidanti, tutti valutati alla concentrazione di 0.15mM; è stata eseguita anche una prova con la quercetina, per la quale non si è potuto costruire una retta di calibrazione, data la scarsa solubilità della molecola nei mezzi acquosi.

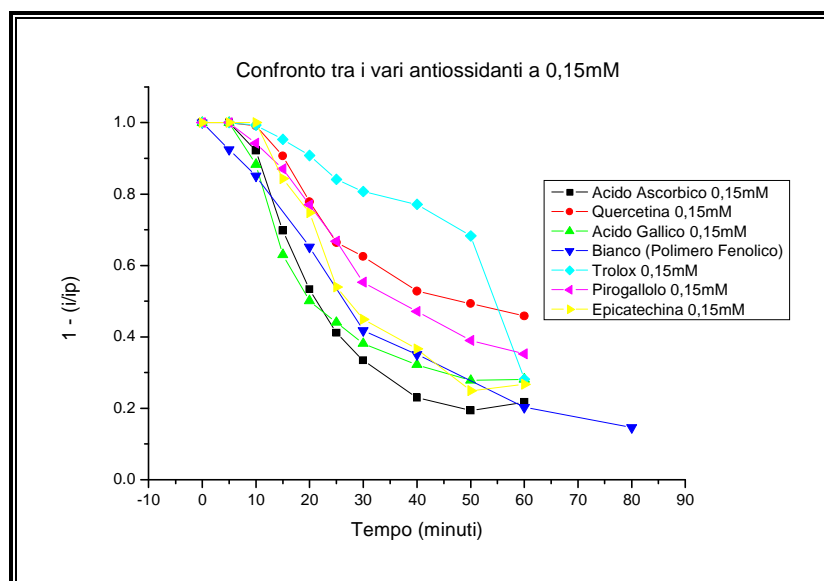


Figura 6.6. Confronto tra le capacità antiossidante a concentrazione costante di diverse molecole.

I valori medi delle lag phase sono state calcolate attraverso una prova in triplo, e mostrate in tabella tabella 6.4:

Composto Antiossidante 0,15mM	Lag Phase [minuti] (valore medio \pm SD)
(L)-Acido Ascorbico	7.2 ± 0.7
Trolox®	11.2 ± 0.9
Acido Gallico	5.0 ± 0.4
Quercetina	10.1 ± 0.9
Pirogallolo	4.9 ± 0.5
(-)-Epicatechina	10.0 ± 0.8

Tabella 6.4. Confronto delle Lag Phase dei diversi Antiossidanti a 0.15mM.

E' stato poi successivamente eseguito un confronto tra le varie rette di calibrazione, valutando come parametro per classificare l'AOC, la pendenza della retta di calibrazione (figura 6.7).

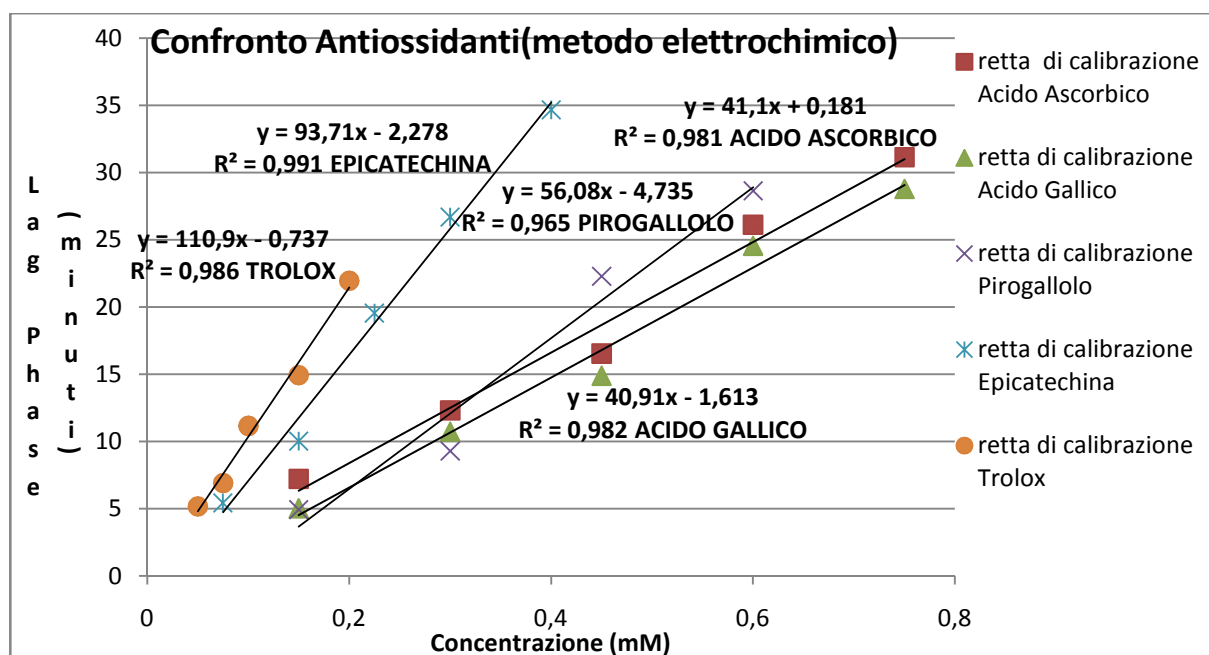


Figura 6.7. Confronto tra le varie rette di calibrazione col metodo elettrochimico.

Si può notare come il Trolox® sia il composto antiossidante più energico nei confronti del radicale idrossile; questo risultato potrebbe essere spiegato considerando che la famiglia dei tocoferoli presenta elevati valori di lag phase, in quanto inibisce i composti radicalici col meccanismo del chain breaking, passando attraverso uno stadio semichinonico ed uno chinonico.

Utilizzando il Trolox® come molecola di riferimento con cui esprimere il valore dell'AOC, si confrontano i valori AOC dei vari composti, come Trolox® equivalente.

Come già detto nella parte sperimentale, il concetto di Trolox® equivalente, deriva dai saggi ORAC e ABTS, e si calcola dal rapporto tra la pendenza della retta di calibrazione di un composto (m_{campione}) e la pendenza della retta di calibrazione del Trolox® ($m_{\text{Trolox®}}$)

$$\text{TEAC} = \frac{m(\text{campione})}{m(\text{Trolox®})}$$

dove l'incertezza associata al parametro TEAC, indicata con σ , viene calcolata con la seguente equazione di propagazione dell'errore:

$$\text{Errore \%} = \sqrt{\left(\frac{s_{\text{Trolox}}}{m_{\text{Trolox}}}\right)^2 + \left(\frac{s_{\text{campione}}}{m_{\text{campione}}}\right)^2}$$

$$\sigma = \text{TEAC} * \text{Errore \%}$$

La classifica della capacità antiossidante, espressa in termini di Trolox equivalente viene indicata in tabella 6.5:

Composto Antiossidante	TEAC
(L)-Acido Ascorbico	0.37 ± 0.04
Acido Gallico	0.36 ± 0.03
Pirogallolo	0.50 ± 0.07
(-)-Epicatechina	0.84 ± 0.08

Tabella 6.5.Valori TEAC per il metodo elettrochimico.

6.1.7)Campione reale

L'analisi dell'AOC di un campione di succo è stata condotta diluendo i campioni secondo i seguenti rapporti di diluizione: 1:750, 1:1000, 1:1500 e 1:2000.

Vengono di seguito riportate le curve cinetiche di degradazione dei vari campioni(figura6.8), da cui si è poi potuto ottenere la curva di calibrazione, espressa in funzione della lag phase (figura 6.9 e tabella 6.6).

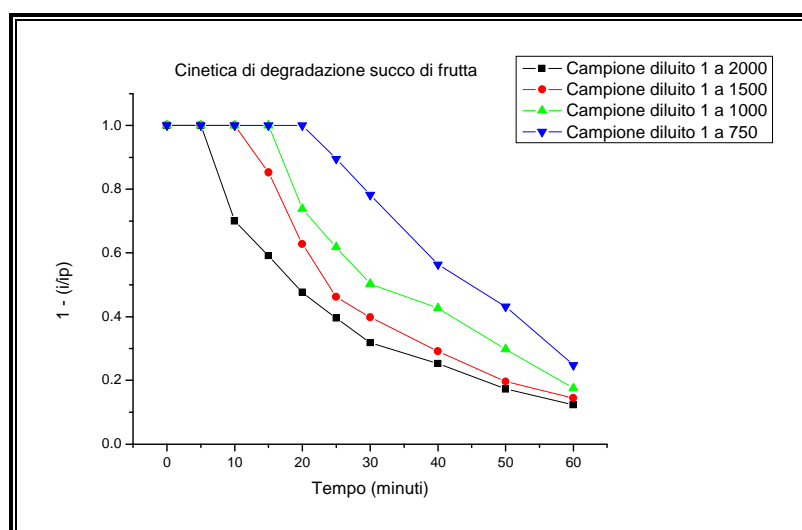


Figura 6.8.Curve di degradazione ottenute sul campione reale.

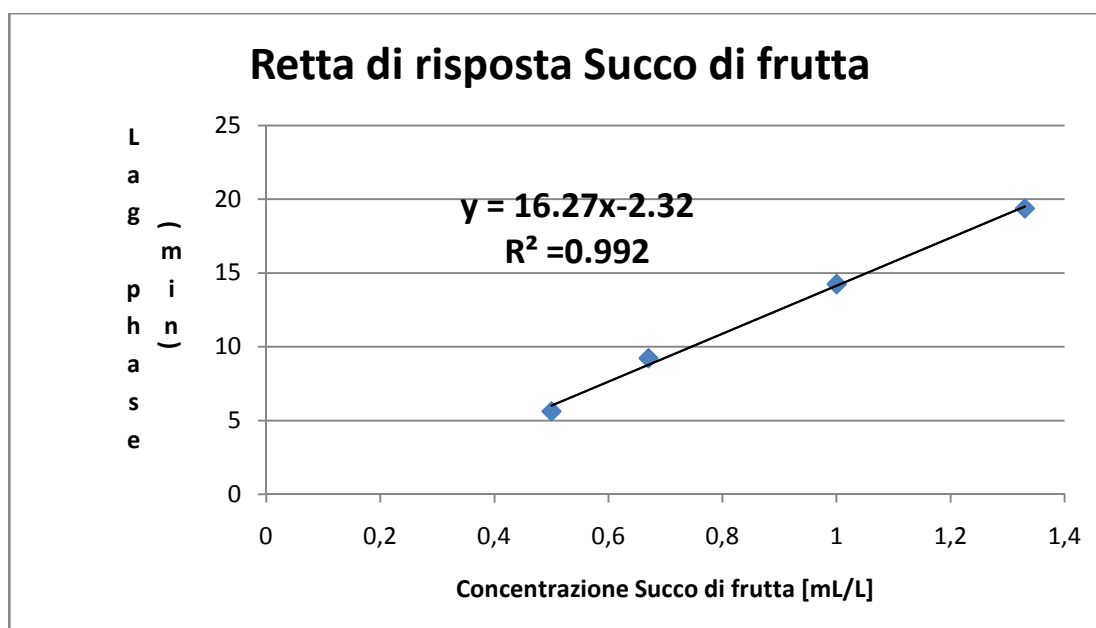


Figura 6.9. Retta di risposta per il campione reale, metodo elettrochimico.

Concentrazione [mL/L]	Lag Phase [min]	R² = 0.992 Pendenza= 16.3 ± 0.7 Intercetta= -2 ± 1 Sx/y= 0.435
0.50	5.61	
0.67	9.21	
1	14.23	
1.33	19.36	

Tabella 6.6. Dati ottenuti dalla retta di risposta del campione reale.

$$TEAC = \frac{16.3}{110.9} = 0.146 \text{ mmol Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalenti/mL succo}$$

Dai dati ottenuti si deduce che la soluzione del succo di frutta diluita 1000 volte, presenta una capacità antiossidante equivalente a quella di una soluzione 0,146mM di Trolox[®].

Dal calcolo della propagazione dell'incertezza, dovuto al rapporto tra i 2 coefficienti angolari, l'errore associato all'indice TEAC è risultato:

$$TEAC = 0.15 \pm 0.01 \text{ mmol Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalenti/mL succo}$$

Un altro modo largamente adottato per valutare la capacità antiossidante è anche quello di effettuare 2 o più misure dello stesso campione, poi, mediante retta di calibrazione del Trolox[®] (figura 5.14), risalire alle mmol equivalenti contenute in 1 mL di campione.

Per le misure in voltammetria ciclica, si sono eseguite tre repliche sul campione diluito 1 a 1000. Si calcolano poi le μmol di Trolox[®] equivalenti col seguente calcolo:

per una soluzione $1\text{mL}_{\text{succo}}/L_{\text{soluzione}}$, si è ottenuto dalla prova in triplo, un valore medio della lag phase corrispondente a 14.23 minuti.

Dalla retta di calibrazione del Trolox[®], valutata in funzione della lag phase, si risale al valore della concentrazione Trolox[®] equivalente, con associato il rispettivo valore di incertezza:

$$\mathbf{0.135 \pm 0.007 \text{ (mmol di Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalente / mL soluzione)}}$$

Volendo esprimere il valore dell'AOC in termini di μmol di Trolox[®] equivalente /mL succo, si ottiene:

$$\begin{aligned} \left(\frac{\mu\text{mol di Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalenti}}{\text{mLsucco}} \right) &= (\text{mmol di Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalente} / L_{\text{soluzione}}) / (\text{ml succo} / L_{\text{soluzione}}) = \\ &= 0.135 \text{ mmol di Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalente} / \text{mL succo} \\ &= \mathbf{135 \pm 7 \mu\text{mol di Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalente} / \text{mL succo.}} \end{aligned}$$

Allo stesso modo può essere calcolato il valore dell'indice VCEAC (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity), che esprime il termine AOC come μmol di acido ascorbico equivalenti per mL di succo di frutta.

Dalla retta di calibrazione dell'acido ascorbico, valutata in termini di lag phase, si risale al valore della concentrazione di acido ascorbico con analoga capacità antiossidante.

Dalla retta si ottiene:

$$\mathbf{0.34 \pm 0.03 \text{ mmol di acido ascorbico equivalenti} / \text{mL soluzione}}$$

Che corrisponde al valore VCEAC :

$$\left(\frac{\mu\text{mol di Acido ascorbico equivalenti}}{\text{mLsucco}} \right) = (3,4 \pm 0,3) 10^2 \mu\text{mol di acido ascorbico equivalente} / \text{mL succo.}$$

6.2)Confronto della capacità' antiossidante (AOC) con metodiche analitiche standardizzate.

In questo paragrafo verranno riportati gli indici TEAC e VCEAC calcolati dai dati ottenuti dall'applicazione delle diverse metodiche analitiche standardizzate, descritte nel capitolo 2.

6.2.1) Misure col saggio ABTS .

Vengono di seguito riportate le cinetiche (figura 6.10) di decolorazione con metodologia ABTS seguite per via spettrofotometrica, per il Trolox[®] ed acido ascorbico che sono i 2 antiossidanti impiegati per effettuare la determinazione quantitativa del campione reale (tabella 6.7 e figura 6.11). Possiamo osservare come tutte le cinetiche avvengano rapidamente e come si raggiunga istantaneamente un plateau del valore di assorbanza misurata.

Tutte le cinetiche per le molecole antiossidanti sonda, sono state effettuate in triplo. È importante osservare che in questo caso non si valuta la capacità dell'antiossidante di proteggere un substrato, ma la quantità di radicale $\text{ABTS}^{\cdot+}$ che reagisce con il nostro antiossidante; quindi, a parità di concentrazione, maggiore è il decremento del segnale e maggiore è la capacità antiossidante del campione.

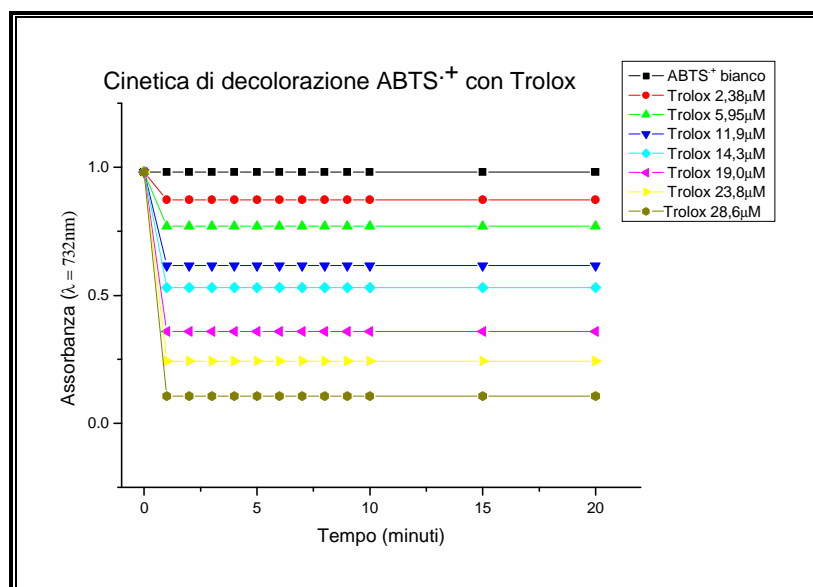


Figura 6.10 Cinetiche di consumo dell'ABTS radicale ($1.5 \cdot 10^{-4}$ M) monitorata per via spettrofotometrica ($\lambda_{\text{max}} = 732 \text{ nm}$) in presenza di Trolox® a varie concentrazioni.

Concentrazione TROLOX® [μM]	Decremento % di Assorbanza ($A_{732\text{nm}}$)	$R^2 = 0.998$ Pendenza= 0.030 ± 0.001 Intercetta=0.03 ± 0.01 $Sx/y = 0.015$
2.38	0.110	
5.95	0.215	
11.9	0.372	
14.3	0.460	
19.0	0.634	
23.8	0.752	
28.6	0.892	

Tabella 6.7 :Dati della retta di calibrazione del Trolox®(saggio ABTS).

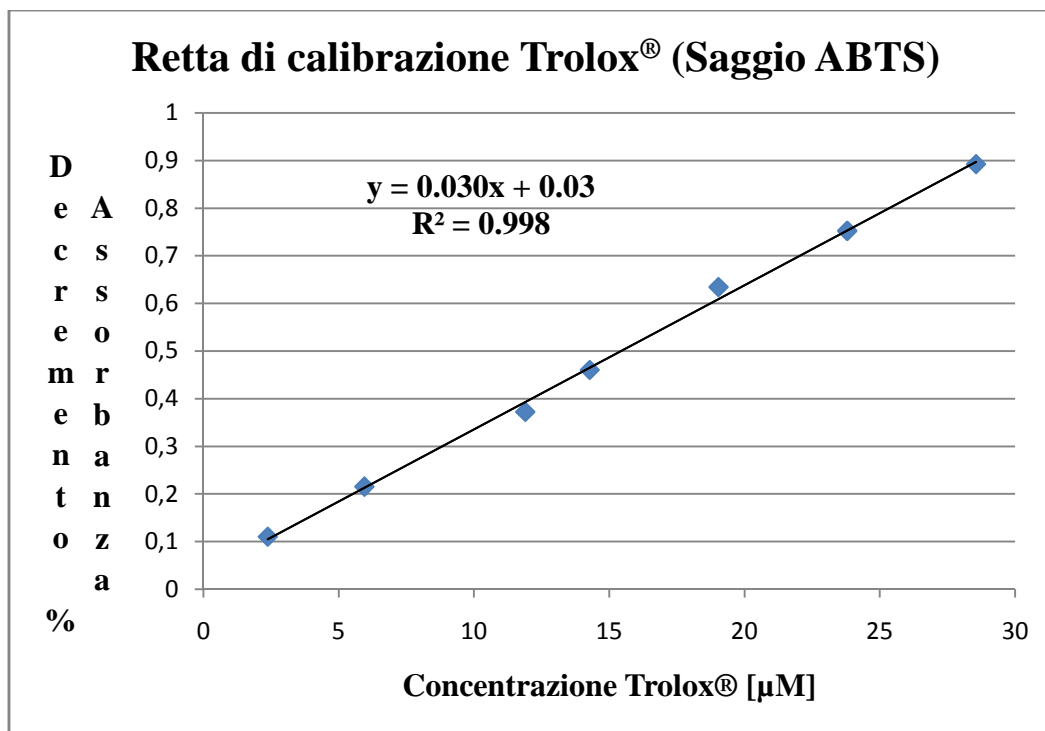


Figura6.11. Retta di calibrazione con Trolox®, saggio ABTS.

Di seguito viene riportata, a titolo di esempio, anche la cinetica di decolorazione per l'acido ascorbico, (Figura 6.12), la rispettiva retta di calibrazione (Figura 6.13) e la tabella 6.8:

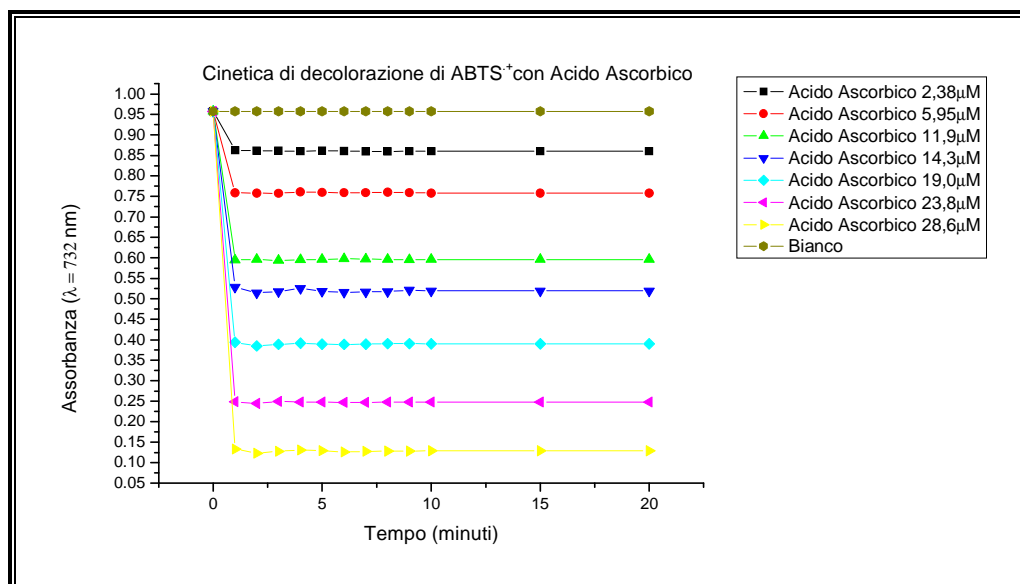


Figura 6.12 Cinetica di decolorazione dell' Acido Ascorbico a diverse concentrazioni, per 20 minuti.

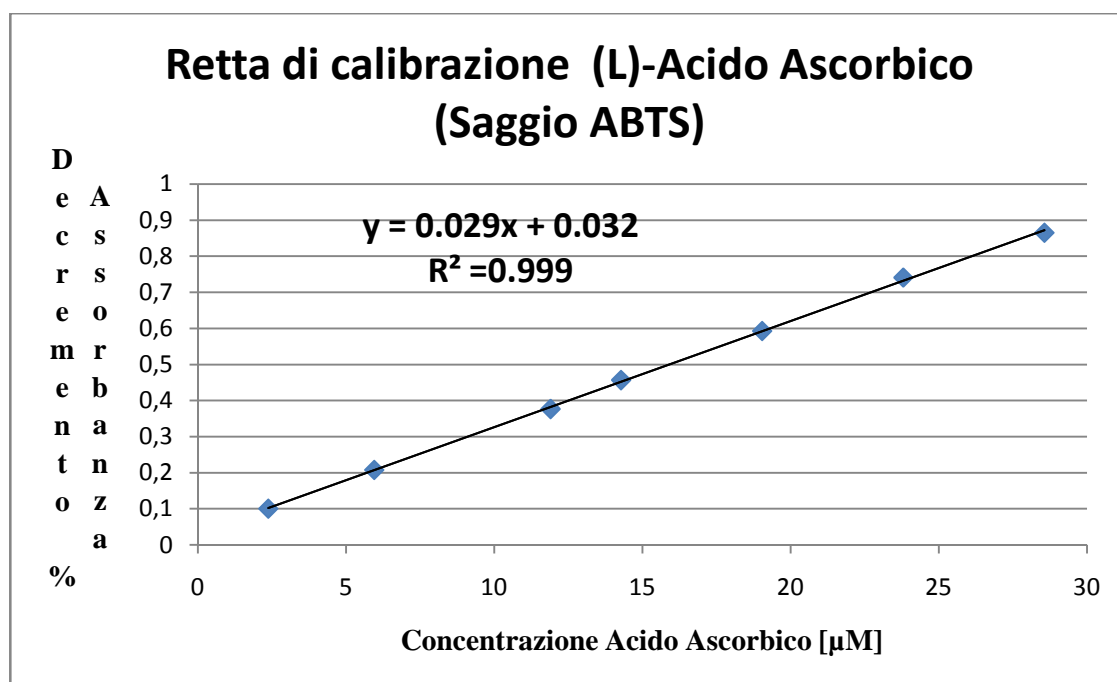


Figura 6.13 Retta di calibrazione con Acido Ascorbico, saggio ABTS.

Concentrazione <u>ACIDO</u> <u>ASCORBICO</u> [μM]	Decremento % di Assorbanza ($A_{732\text{nm}}$)	$R^2 = 0.999$ Pendenza= 0.0294 \pm 0.0003 Intercetta= 0.032 \pm 0.005 $S_x/y = 0.006$
2.38	0.101	
5.95	0.208	
11.9	0.377	
14.3	0.457	
19.0	0.593	
23.8	0.741	
28.6	0.865	

Tabella 6.8: Dati della retta di calibrazione dell' (L)-Acido Ascorbico (saggio ABTS).

6.2.2) Confronto della capacit  antiossidante dei vari composti col saggio ABTS.

In figura 6.14 sono riportati i valori di decremento % di assorbanza per i vari antiossidanti in funzione della concentrazione utilizzate.

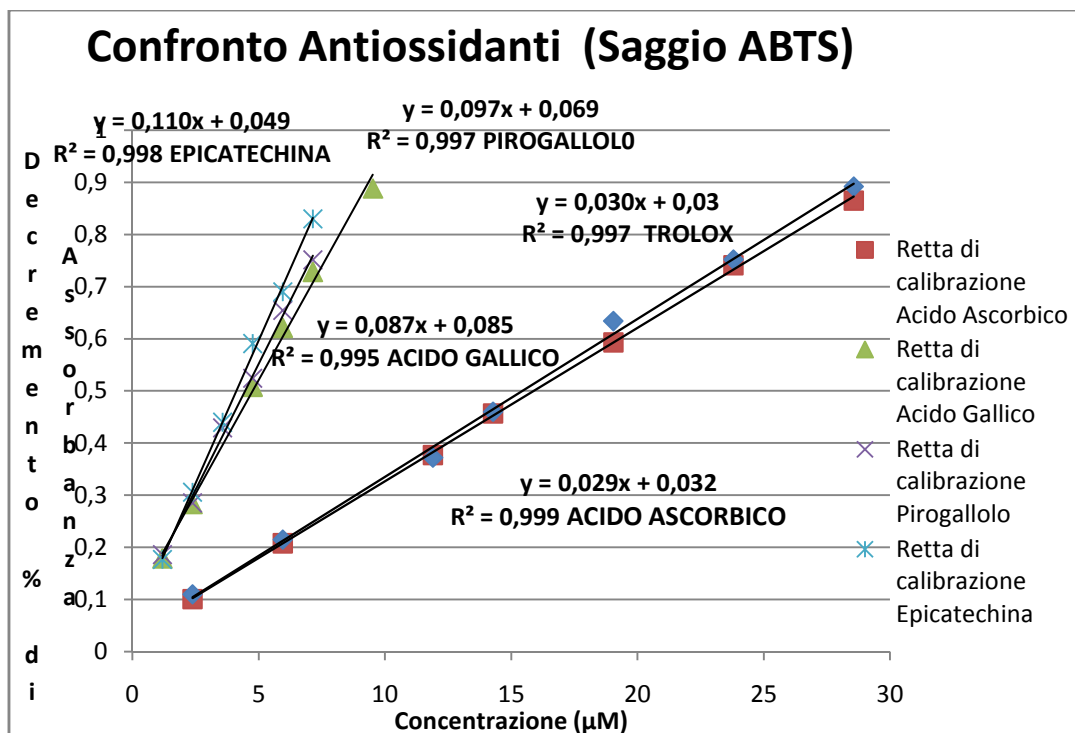


Figura 6.14 Confronto rette di calibrazione per il saggio ABTS.

Rapportando le pendenze delle rette ottenute al valore della pendenza del Trolox® possiamo calcolare il valore di TEAC per i vari antiossidanti. In tabella 6.9 sono anche riportati i valori di TEAC ritrovati in letteratura per una prova effettuata a pH 4.5[47]. Possiamo osservare come il pH influenzi in modo decisivo i meccanismi di trasferimento dell'atomo di idrogeno e di conseguenza il parametro AOC.

Composto Antiossidante	Indice TEAC calcolato	Indice TEAC da letteratura[47]
(L)-Acido ascorbico	0.97 ± 0.03	1.0 ± 0.1
Acido Gallico	2.90 ± 0.05	6.3 ± 0.4
Pirogallolo	3.35 ± 0.04	/
(-)-Epicatechina	3.67 ± 0.04	/

Tabella 6.9. Confronto degli indici TEAC per i vari composti antiossidanti (saggio ABTS).

Dal confronto poi tra gli indici TEAC del metodo elettrochimico in voltammetria ciclica e del saggio ABTS, si possono riscontrare delle forti anomalie: mentre col saggio ABTS, il Trolox® e l'Acido Ascorbico hanno un valore di AOC pressochè analogo e tale test non è in grado di fare una distinzione, nel metodo elettrochimico invece la differenza è molto più evidente, dal momento che la retta di calibrazione del Trolox® presenta una pendenza circa 2,68 volte superiore.

6.2.3) Metodo ABTS applicato all'analisi del campione reale.

Per il saggio ABTS il campione reale è stato sottoposto ai seguenti rapporti di diluizione: 1:500, 1:100, 1:50, 1:25 e 1:17.

In cuvetta sono stati fatti reagire 100 μ L dei rispettivi campioni ottenuti per diluizione, con 2mL della soluzione ABTS^{•+} $1.5 \cdot 10^{-4}$ M, monitorando per 20 minuti, la cinetica di decolorazione del composto radicalico, alla lunghezza d'onda di 732nm. Il grafico dell'andamento dell'assorbanza a 732nm in funzione del tempo, per tutti i rispettivi campioni diluiti è indicato in figura 6.15:

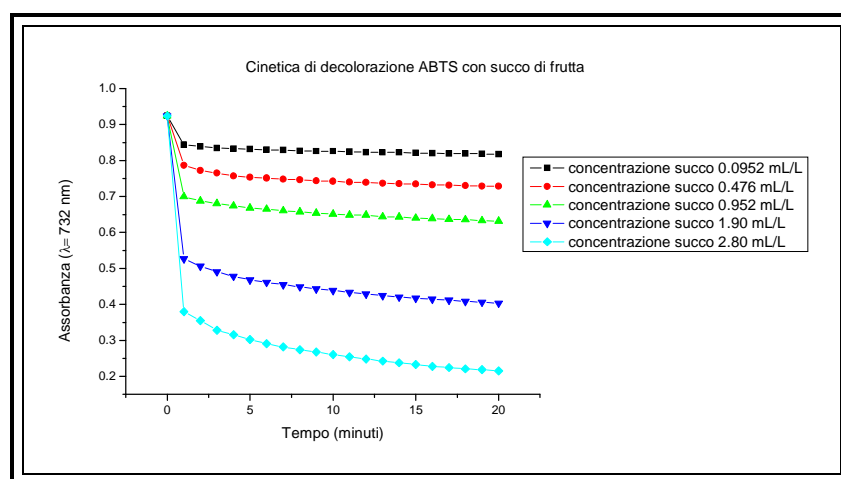


Figura 6.15. Cinetica di decolorazione ABTS per succo di frutta a diverse concentrazioni.

Dai dati relativi alle diverse diluizioni del succo, si è costruita la retta di risposta specifica (figura 6.16 e tabella 6.10) per il campione in esame, la cui pendenza viene correlata con quella della retta di calibrazione del Trolox[®] al fine di valutare l'indice TEAC.

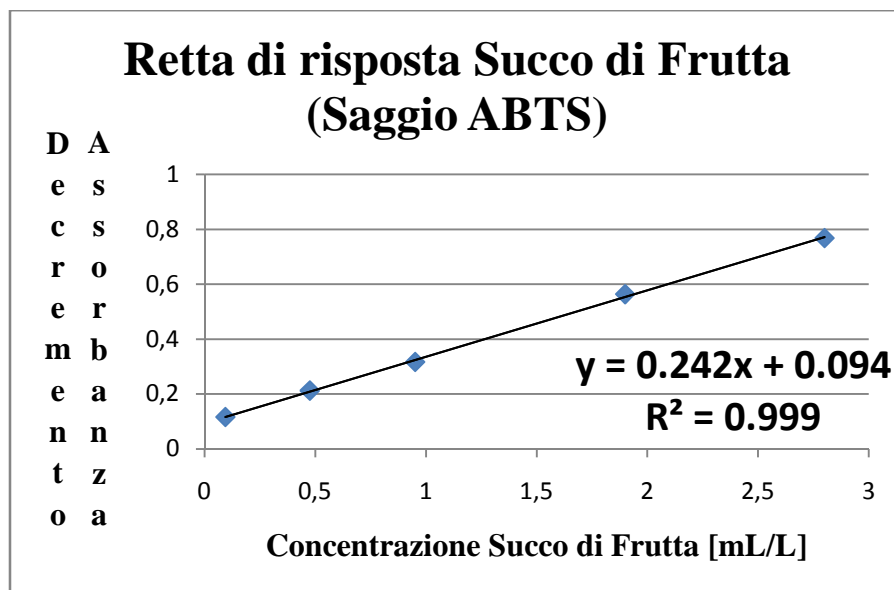


Figura 6.16. Retta di risposta per il campione reale (saggio ABTS).

Concentrazione <u>SUCCO DI</u> <u>FRUTTA</u> [mL/L]	Decremento di Assorbanza (A_{732nm})	$R^2 = 0.999$ Pendenza= 0.242 ± 0.004 Intercetta= 0.094 ± 0.006 $S_{x/y} = 0.008$
0.0952	0.116	
0.476	0.212	
0.952	0.316	
1.90	0.563	
2.80	0.767	

Tabella 6.10. Dati della retta di risposta per il campione reale (saggio ABTS).

L'indice TEAC per il succo di frutta è stato così calcolato:

$$TEAC = \frac{0.242}{0.0300} = 8.07 \mu\text{mol Trolox}^{\circledR} \text{ equivalente/ mL succo}$$

ciò sta ad indicare il fatto che 1 mL di succo ha un potere antiossidante pari a $8.07 \mu\text{mol}$ di Trolox[®].

Valutando l'incertezza sul rapporto dei coefficienti angolari delle 2 rette, si ottiene:

$$TEAC = 8.1 \pm 0.3 \mu\text{mol Trolox}^{\circledR} \text{ equivalente/ mL succo}$$

Anche in questo caso la capacità antiossidante è stata ricavata replicando per 3 volte l'analisi dello stesso campione, poi, mediante retta di calibrazione del Trolox® (figura 6.11), si è risaliti alle μmol equivalenti.

E' stata condotta in triplo l'analisi del campione diluito 1 a 25, da cui è risultato come valore medio di decremento di assorbanza 0.563, che corrisponde ad una concentrazione di Trolox® equivalente pari a 17.5 μM .

Si calcolano poi le μmol di Trolox® equivalente (TEAC):

$$\begin{aligned}\mu\text{mol equivalenti di Trolox}^\circ &= (\text{concentrazione equivalente di Trolox}) * (\text{volume di reazione}) = \\ &= 17.5 \mu\text{M} * (2,1 * 10^{-3}) \text{ L} = 0.037 \mu\text{mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} &= \left(\frac{\mu\text{mol di Trolox}^\circ \text{ equivalenti}}{\text{volume aggiunto}} \right) * (\text{fattore diluizione}) * (\text{fattore di conversione}) = \\ &= \left(\frac{0,037 \mu\text{mol}}{100 \mu\text{L}} \right) * 25 * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} = 9.25 \mu\text{mol equivalenti di Trolox}^\circ / \text{mL succo}\end{aligned}$$

Attraverso poi la retta dei minimi quadrati si associa il valore di incertezza relativo al dato ottenuto:

$$\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} = 9.3 \pm 0.9 \mu\text{mol di Trolox}^\circ \text{ equivalente /mL succo di frutta.}$$

Si calcolano poi le μmol di Acido ascorbico equivalente (VCEAC):

$$\text{VCEAC} = \frac{0,242}{0,0290} = 8.34 \text{ Acido ascorbico equivalente}$$

Dalla retta di calibrazione dell'acido ascorbico, si può esprimere il valore di AOC, coi seguenti calcoli:

$$\begin{aligned}\mu\text{mol equivalenti di acido ascorbico} &= (\text{concentrazione di acido ascorbico equivalente}) * (\text{volume di reazione}) = \\ &= 18.0 \mu\text{M} * (2,1 * 10^{-3}) \text{ L} = 0.038 \mu\text{mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} &= \left(\frac{\mu\text{mol di acido ascorbico equivalenti}}{\text{volume aggiunto}} \right) * (\text{fattore diluizione}) * (\text{fattore di conversione}) = \\ &= \left(\frac{0,038 \mu\text{mol}}{100 \mu\text{L}} \right) * 25 * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} = 9.45 \mu\text{mol di acido ascorbico equivalenti /mL succo}\end{aligned}$$

Attraverso poi la retta dei minimi quadrati si associa il valore di incertezza relativo al dato ottenuto:

$$\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} = 9 \pm 1 \mu\text{mol di acido ascorbico equivalente /mL succo di frutta.}$$

6.3) Saggio DPPH.

6.3.1) Misure del saggio DPPH.

Si è costruita la retta di calibrazione del DPPH dagli spettri di assorbimento a diverse concentrazioni (figura 6.17) in soluzione di metanolo, da cui si è poi potuto stimare il coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda di lavoro, $\epsilon_{\lambda_{\max}}$, pari a 11823 ± 218 ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$):

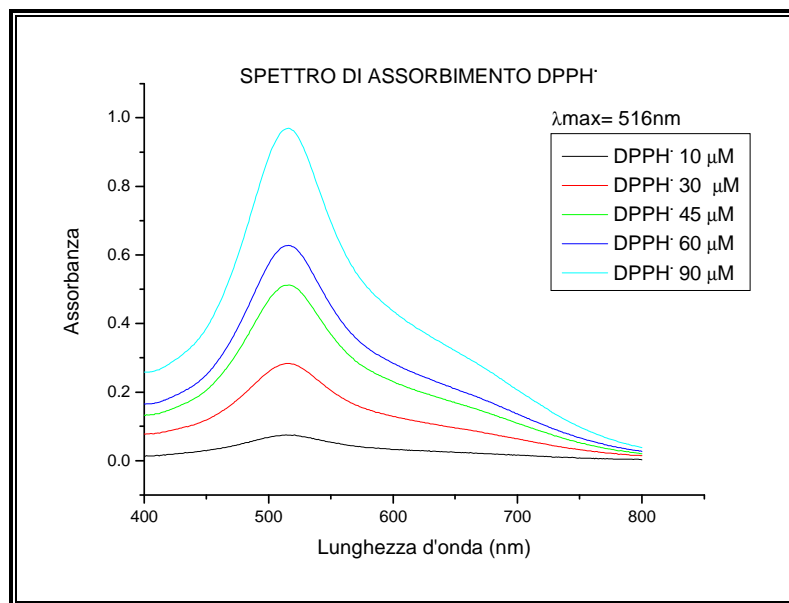


Figura 6.17. Spettri di assorbimento a diverse concentrazioni di DPPH.

Si ricava poi la seguente retta di calibrazione, mostrata in tabella 6.11 e figura 6.18:

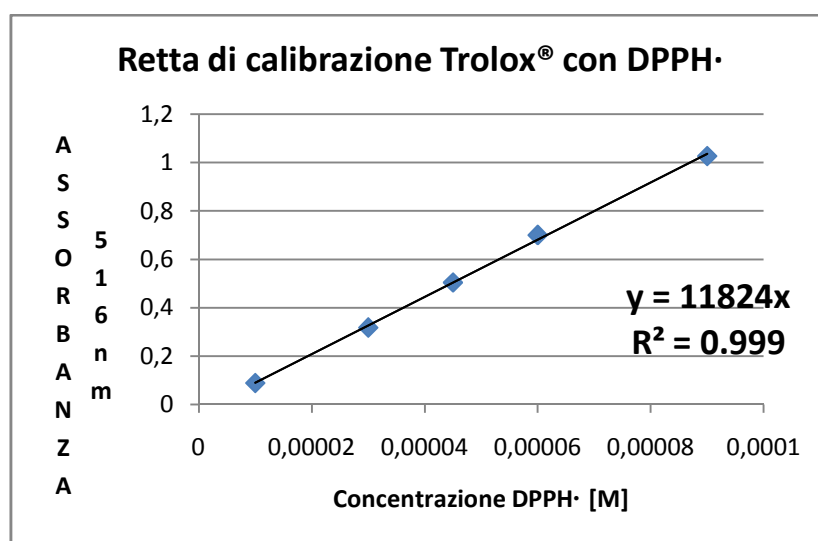


Figura 6.18. Retta di calibrazione del Trolox con saggio DPPH.

Successivamente sono state effettuate studiate le cinetiche di consumo del DPPH· in presenza di Trolox® a diverse concentrazioni (figura 6.19). Possiamo osservare come anche in questo caso si monitori il consumo del radicale DPPH· in funzione del tempo e non la capacità dell'antiossidante di proteggere una molecola target dalla degradazione, in analogia con la metodologia ABTS.

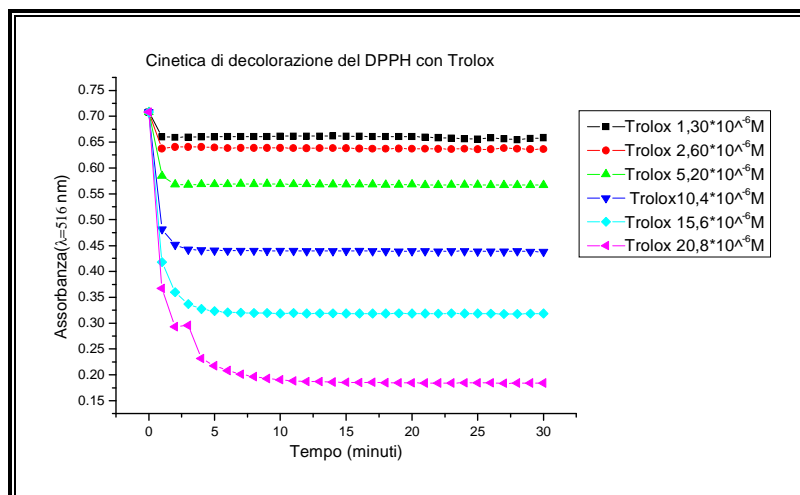


Figura 6.19 .Cinetica di decolorazione del DPPH a diverse concentrazioni di Trolox®.

Anche in questo caso maggiore è il grado di decolorazione, maggiore è la capacità antiossidante del composto in esame, a parità di concentrazione. In figura 6.20 sono state riportate le decolorazioni osservate per i vari composti studiati a diverse concentrazioni, e le interpolazioni effettuate.

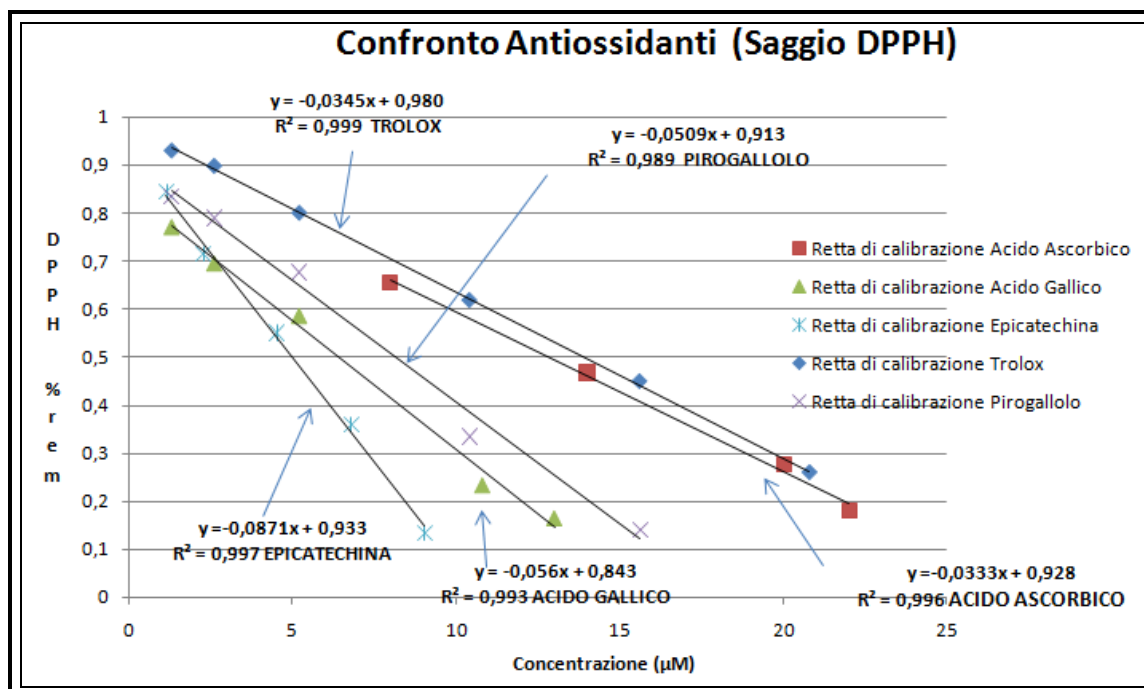


Figura 6.20 Confronto rette di calibrazione per il saggio DPPH.

La valutazione della capacità può essere espressa attraverso tre diversi parametri: TEAC, EC₅₀, e il parametro n. Il parametro TEAC è anche in questo caso è il Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity. L'EC₅₀ è la concentrazione di antiossidante necessaria per determinare un calo del 50 % del valore iniziale di assorbanza. Infine il parametro n indica il numero di funzionalità ossidriliche –OH presenti su di una molecola di antiossidante, e quindi è un indice stechiometrico per valutare quanti radicali DPPH· un composto è in grado di spegnere. Viene di seguito riportata la tabella 6.11 coi valori di EC₅₀, il coefficiente stechiometrico n della reazione ed il parametro TEAC. Sono mostrati per confronto gli stessi indici calcolati da Villano et al.[48]:

Composto	EC ₅₀ calcolato (10 ⁻⁶ M)	EC ₅₀ letteratura [48] (10 ⁻⁶ M)	n –OH calcolato	n –OH da letteratura [48]	Indice TEAC calcolato
Trolox	13.90 ± 0.16	14.1 ± 0.0	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.4	1.00 ± 0.02
(L)-Acido ascorbico	12.86 ± 0.43	11.8 ± 0.2	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.2	0.97 ± 0.04
Acido gallico	6.39 ± 0.39	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.5	5.6 ± 0.2	1.55 ± 0.07
Pirogallolo	8.13 ± 0.60	/	4.7 ± 0.6	/	1.47 ± 0.04
(-)-Epicatechina	4.97 ± 0.18	4.5 ± 0.2	6.7 ± 0.6	6.6 ± 0.7	2.52 ± 0.09

Tabella 6.11. Dati relativi ai valori EC₅₀ e n calcolati e tratti dal lavoro di Villano et al.[48].

Dalla tabella si può notare come alcuni composti tra cui acido gallico, pirogallolo e (-)-epicatechina, molecole che per il saggio DPPH, risultano essere dei buoni antiossidanti, abbiano un valore del coefficiente n più elevato rispetto al numero degli gruppi ossidrilici che effettivamente presentano.

Secondo il lavoro di Villano et al.[48], il motivo di ciò, è dovuto al fatto che la presenza di funzionalità ossidriliche disposte in posizione orto, favorisca la formazione di legami a ponte ad idrogeno all'interno della molecola fenolica. Queste interazioni a ponte ad idrogeno sono energeticamente più elevate di quelle che la molecola ha col solvente, stabilizzando così la struttura molecolare.

4.3) Metodo DPPH applicato all'analisi del campione reale.

Il campione di succo di frutta, è stato sottoposto alle seguenti diluizioni, 1:100, 1:50, 1:25, 1:12,5 e 1:10, in ambiente metanolico.

In cuvetta sono stati fatti reagire 80 μl dei rispettivi campioni ottenuti per diluizione, con 3 ml della soluzione DPPH $65 \mu\text{M}$, monitorando per 30 minuti, la cinetica di decolorazione del composto radicalico, alla lunghezza d'onda di 516 nm, relativa al massimo di assorbimento.

Il grafico dell'andamento dell'assorbanza a 516 nm in funzione del tempo, per tutti i rispettivi campioni diluiti è indicato in figura 6.21:

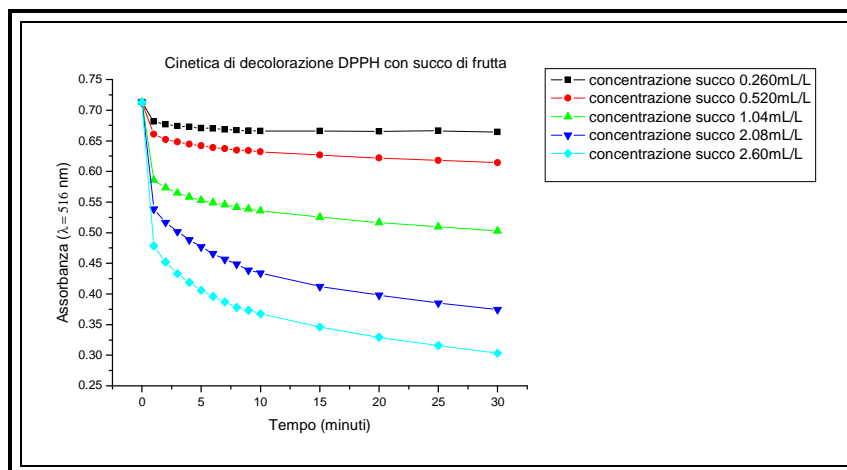


Figura 6.21 Cinetiche di decolorazione DPPH con succo di frutta a diverse concentrazioni.

Dalle curve di decolorazione, si ricava poi una retta di calibrazione, con cui quantificare il valore dell'AOC col metodo DPPH (figura 6.22):

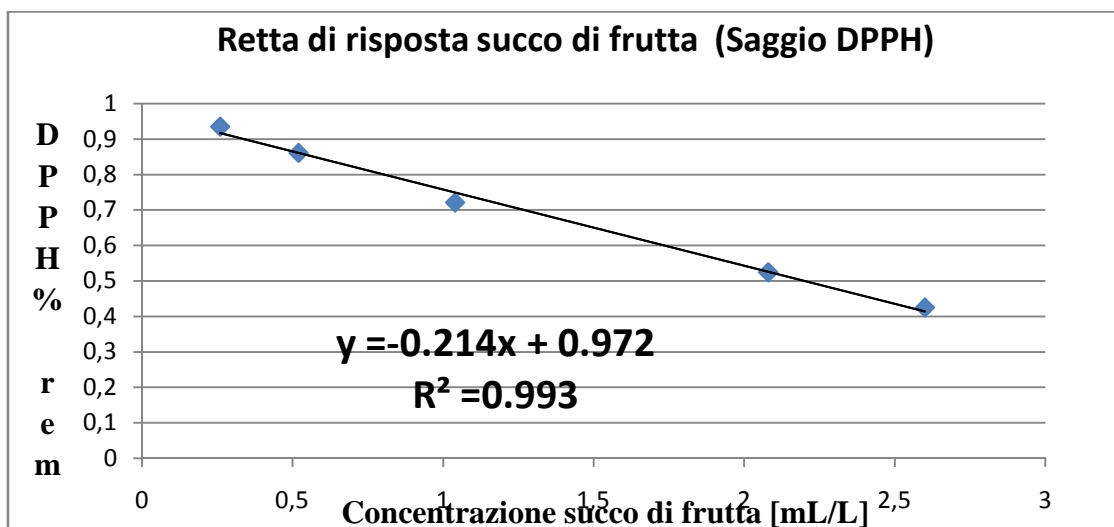


Figura 6.22 Retta di risposta succo per campione reale, saggio DPPH.

Concentrazione <u>SUCCO DI</u> <u>FRUTTA</u> [mL/L]	DPPH % rem	$R^2 = 0.993$ Pendenza = -0.21 \pm 0.01
0.260	0.935	

0.520	0.861	Intercetta= 0.97 \pm 0.02 Sx/y= 0.020
1.04	0.721	
2.08	0.524	
2.60	0.425	

Tabella 6.12. Dati della retta di risposta per campione reale, saggio DPPH.

Anche per il saggio DPPH, si può valutare l'indice TEAC per il succo di frutta, mediante sempre il rapporto tra le pendenze delle rette del campione e del Trolox®:

$$TEAC = \frac{-0.214}{-0.0345} = 6.20 \text{ Trolox}^{\circledast} \text{ equivalente}$$

per cui la soluzione metanolica del succo di frutta, avente concentrazione 1mL/L, presenta la stessa capacità antiossidante di una soluzione 6.20μM di Trolox®.

Considerando l'incertezza derivante dal rapporto dei 2 coefficienti angolari, si ottiene:

$$TEAC = 6.2 \pm 0.3 \text{ Trolox}^{\circledast} \text{ equivalente}$$

Anche per il saggio DPPH, il parametro AOC è stato determinato replicando per 3 volte l'analisi di uno stesso campione, poi, attraverso la retta di calibrazione del Trolox®, si risalgono alle moli equivalenti.

Dall'analisi effettuata in doppio del campione diluito 1 a 25, è risultato come valore medio di DPPH% rem 0.721, che corrisponde ad una concentrazione di Trolox® equivalente pari a 7.51 μM.

Si calcolano poi le μmol equivalenti di Trolox®:

$$\begin{aligned} \mu\text{mol Trolox}^{\circledast} \text{ equivalente} &= (\text{concentrazione equivalente di Trolox}) * (\text{volume di reazione}) = \\ &= 7.51 \mu\text{M} * (3.08 * 10^{-3}) \text{ L} = 0.023 \mu\text{mol di Trolox}^{\circledast} \text{ equivalente} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{AOC}_{\text{succo di frutta}} &= \left(\frac{\mu\text{mol equivalenti di Trolox}^{\circledast}}{\text{volume aggiunto}} \right) * (\text{fattore diluizione}) * (\text{fattore di conversione}) = \\ &= \left(\frac{0.023 \mu\text{mol}}{80 \mu\text{L}} \right) * 25 * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} = 7.19 \mu\text{mol equivalenti di Trolox}^{\circledast} / \text{mL succo} \end{aligned}$$

Attraverso poi la retta dei minimi quadrati si associa il valore di incertezza relativo al dato ottenuto:

$$\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} = 7.2 \pm 0.5 \mu\text{mol di Trolox}^{\circledast} \text{ equivalente/mL succo di frutta.}$$

Allo stesso modo si può calcolare l'indice VCEAC, dal rapporto dei coefficienti angolari:

$$VCEAC = 6.5 \pm 0.4 \mu\text{mol di Acido ascorbico equivalente/mL succo di frutta}$$

Dall'analisi effettuata in doppio del campione diluito 1 a 25, è risultato come valore medio di DPPH% rem 0.721, che corrisponde ad una concentrazione di acido ascorbico equivalente pari a 6.21 μM .

$$\begin{aligned} \mu\text{mol acido ascorbico equivalente} &= (\text{concentrazione equivalente di ac. ascorbico}) * (\text{volume di reazione}) = \\ &= 6.21 \mu\text{M} * (3.08 * 10^{-3}) \text{ L} = 0.019 \mu\text{mol di acido ascorbico equivalente} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} AOC_{\text{succo di frutta}} &= \left(\frac{\mu\text{mol di acido ascorbico equivalenti}}{\text{volume aggiunto}} \right) * (\text{fattore diluizione}) * (\text{fattore di conversione}) = \\ &= \left(\frac{0.019 \mu\text{mol}}{80 \mu\text{L}} \right) * 25 * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} = 5.94 \mu\text{mol equivalenti di acido ascorbico /mL succo} \end{aligned}$$

Attraverso poi la retta dei minimi quadrati si associa il valore di incertezza relativo al dato ottenuto:

$$AOC_{\text{succo di frutta}} = 5.9 \pm 0.6 \mu\text{mol equivalenti di acido ascorbico/mL succo di frutta.}$$

6.3) Saggio ORAC.

6.3.1) Misure del saggio ORAC.

Per la costruzione della retta di calibrazione col Trolox®, si è lavorato con soluzioni 6.00, 8.00, 10.0, 20.0 e 30.0 μM (figura 6.23). Si può notare come le curve cinetiche presentino un andamento con una fase di induzione iniziale seguita dal decadimento di fluorescenza una volta consumato completamente tutto il Trolox®.

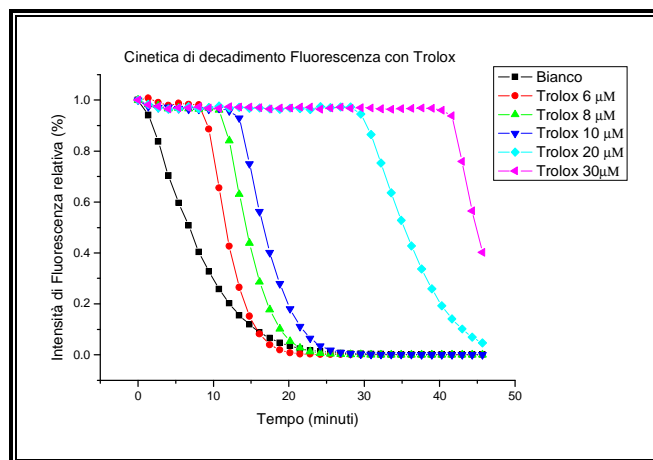


Figura 6.23. Cinetica di decadimento fluorescenza a diverse concentrazioni di Trolox®.

Esprimendo il valore di AUC in funzione delle concentrazioni di Trolox® effettive in cuvetta, si ricava la seguente retta di calibrazione (figura 6.24) coi rispettivi dati indicati in tabella 6.13:

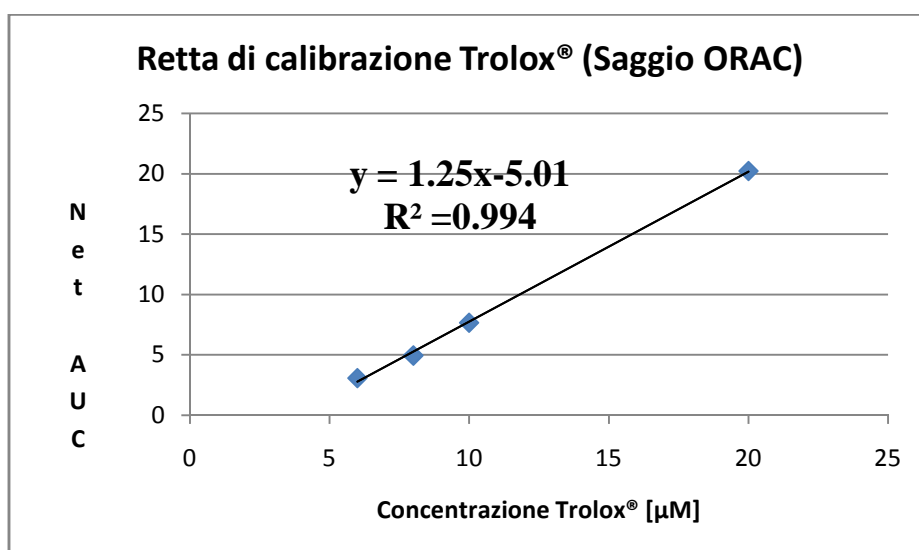


Figura 6.24. Retta di calibrazione ottenuta col Trolox, ottenuta col saggio ORAC.

Concentrazione <u>TROLOX®</u> [μM]	Net AUC	R² = 0.994	
6.0	3.09	Pendenza=1.25 ± 0.02 Intercetta= -5 ± 0 Sx/y= 0.316	
8.0	4,96		
10.0	7.68		
20.0	20.2		

Tabella 6.13 Dati per la retta dei minimi quadrati per il Trolox®, saggio ORAC

Analogamente per l'acido ascorbico è stata ottenuta una retta di calibrazione con pendenza (0.53 ± 0.02) e intercetta di (-1.1 ± 0.5).

6.3.3) Confronto della capacità antiossidante dei vari composti col saggio ORAC.

In figura 6.25 vengono mostrate le diverse rette di calibrazione ottenute per i 5 composti antiossidanti studiati.

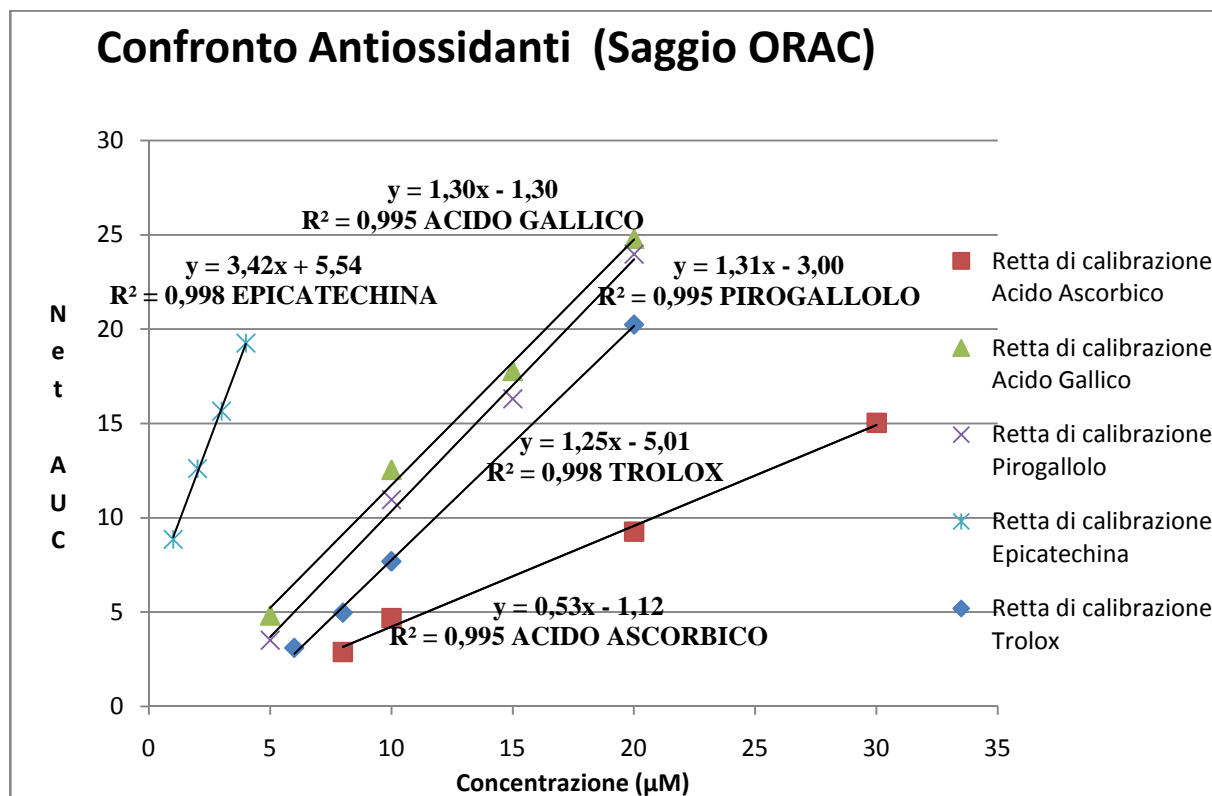


Figura 6.25. Rette di calibrazione per i vari antiossidanti, saggio ORAC.

Dalle rette di taratura riportate in figura è stato possibile calcolare l'indice TEAC per i vari antiossidanti (tabella 6.14):

Composto Antiossidante	Indice TEAC calcolato
(L)-Acido ascorbico	0.42 ± 0.02
Acido Gallico	1.04 ± 0.05
Pirogallolo	1.05 ± 0.06
(-)-Epicatechina	2.74 ± 0.08

Tabella 6.14. Confronto degli indici TEAC per i vari composti antiossidanti (saggio ORAC).

Dai dati in tabella 6.14 emerge una forte analogia nella capacità antiossidante tra Trolox®, acido gallico e pirogallolo, mentre la (-)-epicatechina risulta essere il composto più efficiente nella rimozione di radicali alchil perossidici ROO·.

6.3.4) Metodo ORAC applicato all’analisi di un campione reale di un succo di frutta.

Per il saggio ORAC, il campione di succo di frutta da introdurre in cuvetta, è stato diluito secondo i rapporti 1:1000, 1:500, 1:133 e 1:100.

La cinetica di decadimento della fluorescenza per i 4 campioni diluiti, viene riportata in figura 6.26, a cui segue tabella 6.15 coi rispettivi dati della retta di risposta.

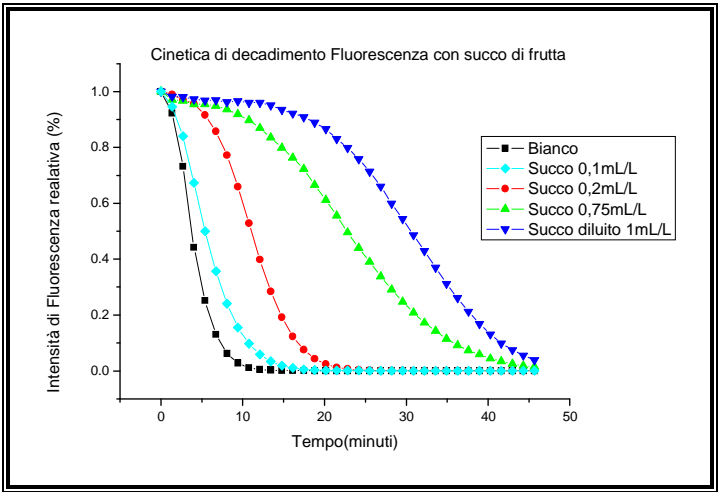


Figura 6.26. Cinetica di decadimento Fluorescenza per succo di frutta a diverse diluizioni.

Concentrazione <u>SUCCO DI</u> <u>FRUTTA</u> [mL/L]	Net AUC	<div> R²= 0.994 </div> <div> Pendenza=19 ± 1 </div> <div> Intercetta= 0.7 ± 0.6 </div> <div> Sx/y= 0.741 </div>
0.100	1.88	
0.200	5.20	
0.750	14.8	
1.00	19.2	

Tabella 6.15 Dati salienti per la retta dei minimi quadrati per il succo di frutta, saggio ORAC

Sempre dal rapporto tra le pendenze della curva di calibrazione del succo di frutta e quella del Trolox[®], è possibile ricavare il valore dell'indice TEAC:

$$TEAC = \frac{18.6}{1.25} = 14.9 \text{ equivalenti di Trolox}^{\text{®}}$$

da cui si evince che la soluzione di succo diluita nel rapporto 1mL/L, secondo il saggio ORAC, presenta la stessa capacità antiossidante di una soluzione 14.9µM di Trolox[®].

Considerando poi l'incertezza derivante dal rapporto dei 2 coefficienti angolari, si ottiene:

$$TEAC = 14.9 \pm 0.8 \text{ di Trolox}^{\text{®}} \text{ equivalenti}$$

Il campione diluito nel rapporto 1:133, è stato analizzato in triplo, da cui è risultato come valore medio di Net AUC 14.8, che corrisponde ad una concentrazione di Trolox[®] equivalente pari a 15.7 µM.

Si calcolano poi le µmol equivalenti di Trolox[®] valutate per mL di succo:

$$\begin{aligned} \mu\text{mol equivalenti di Trolox}^{\text{®}} &= (\text{concentrazione equivalente di Trolox}^{\text{®}}) * (\text{volume di reazione}) = \\ &= 15.7 \mu\text{M} * (2.00 * 10^{-3}) \text{ L} = 0.031 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{AOC}_{\text{succo di frutta}} &= \left(\frac{\mu\text{mol equivalenti di Trolox}^{\text{®}}}{\text{volume aggiunto}} \right) * (\text{fattore diluizione}) * (\text{fattore di conversione}) = \\ &= \left(\frac{0.031 \mu\text{mol}}{200 \mu\text{L}} \right) * 133 * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} = 20.8 \mu\text{mol equivalenti di Trolox}^{\text{®}}/\text{mL succo} \end{aligned}$$

Attraverso poi la retta dei minimi quadrati si associa il valore di incertezza relativo al dato ottenuto:

$$\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} = 21 \pm 2 \mu\text{mol equivalenti di Trolox}^{\text{®}}/\text{mL succo di frutta.}$$

Analogamente per l'indice VCEAC si ottiene:

$$VCEAC = 35 \pm 2 \text{ di Acido ascorbico equivalenti}$$

Dal campione analizzato in triplo, il cui valore medio di Net AUC delle 3 misure è 14.8, si ottiene una concentrazione acido ascorbico equivalente pari a 29.8µM.

$$\begin{aligned} \mu\text{mol equivalenti di Acido Ascorbico}^{\text{®}} &= (\text{concentrazione equivalente di acido ascorbico}) * (\text{volume di reazione}) = \\ &= 29.8 \mu\text{M} * (2.00 * 10^{-3}) \text{ L} = 0.060 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

$$\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} = \left(\frac{\mu\text{mol equivalenti di acido ascorbico}}{\text{volume aggiunto}} \right) * (\text{fattore diluizione}) * (\text{fattore di conversione}) =$$

$$= \left(\frac{0.060 \mu\text{mol}}{200 \mu\text{L}} \right) * 133 * 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} = 39.6 \mu\text{mol equivalenti di acido ascorbico/mL succo}$$

$\text{AOC}_{\text{succo di frutta}} = 40 \pm 4 \mu\text{mol equivalenti di ascorbico/mL succo di frutta.}$

6.4) Metodo di Folin-Ciocalteu.

La retta di calibrazione con l'acido gallico è stata ottenuta lavorando alle seguenti concentrazioni effettive: 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L, ottenute per diluizione di una soluzione madre 1000mg/L; in figura 6.27 vengono riportati gli spettri di assorbimento alle varie concentrazioni, da cui ricavare la retta di calibrazione figura 6.28 e tabella 6.16):

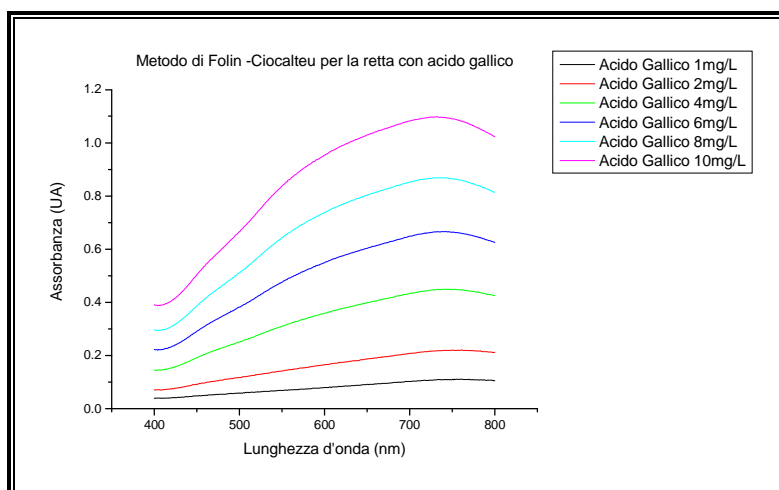


Figura 6.27. Spettri di assorbimento del reattivo F-C a diverse concentrazioni di acido gallico.

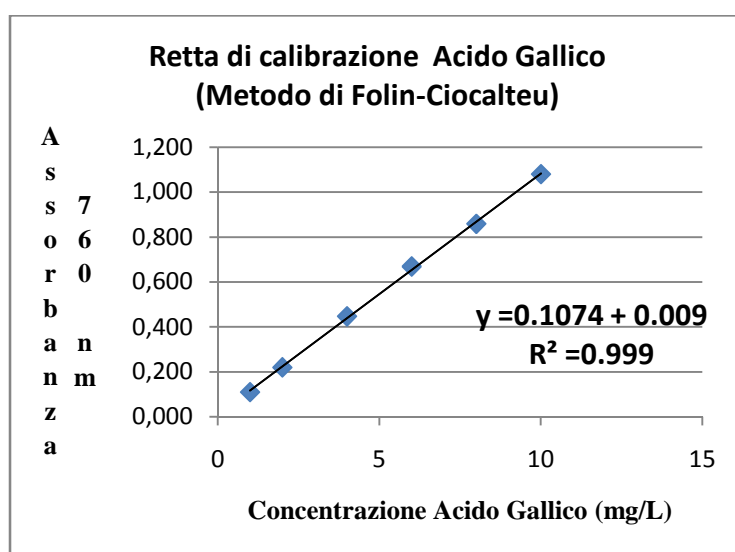


Figura 6.28. Retta di calibrazione con acido gallico, metodo di Folin Ciocalteu.

Concentrazione <u>ACIDO GALLICO</u> [mg/L]	Assorbanza ($A_{760\text{nm}}$)	$R^2 = 0.999$
1.00	0.110	Pendenza= 0.107 \pm 0.001 Intercetta= 0.009 \pm 0.008 Sx/y= 0.011
2.00	0.220	
4.00	0.447	
6.00	0.668	
8.00	0.859	
10.0	1.08	

Tabella:6.16 dati della retta di calibrazione dell'acido gallico, metodo di Folin Ciocalteu.

La classificazione della capacità antiossidante dei vari composti fenolici investigati, espressa come GAE, viene ricavata dal rapporto tra la pendenza della retta di calibrazione del composto e la pendenza della retta di calibrazione dell'acido gallico, usato appunto come molecola di riferimento.

Gli indici GAE per i composti studiati, vengono riportati in tabella 6.17

Composto	Indice GAE
Acido Gallico	1.00 \pm 0,01
Pirogallolo	1.27 \pm 0,05
(-)-Epicatechina	1.17 \pm 0,05

Tabella 6.17 indice GAE dei composti investigati.

Dopo l'ottenimento della retta di calibrazione con acido gallico, è stato analizzato il campione di succo di frutta, lavorando coi seguenti rapporti di diluizione: 1:200, 1:100, 1:50, 1:25 e 1:10 (figura 6.29)

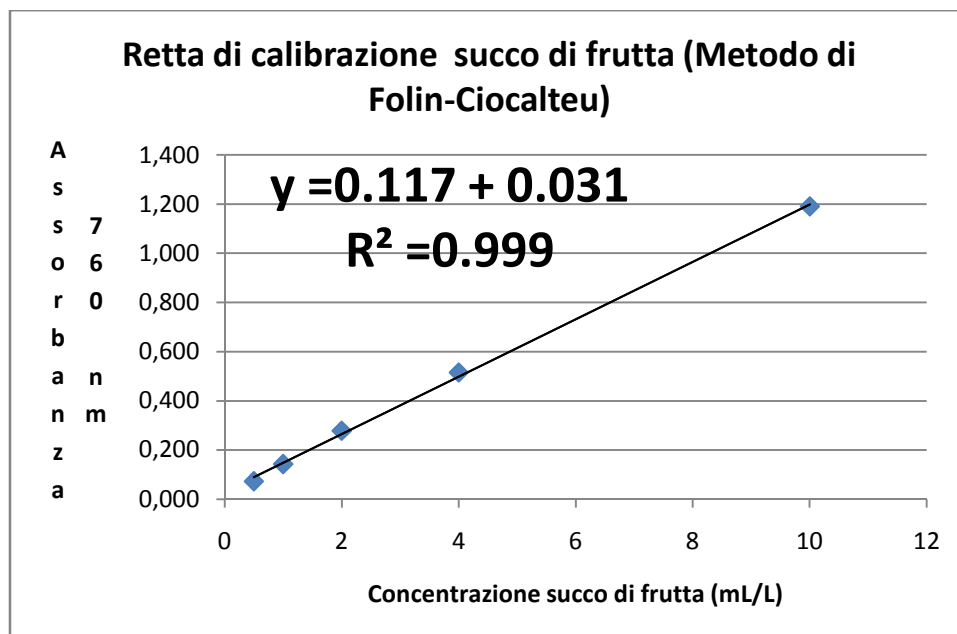


Figura 6.29 Retta di calibrazione acido gallico, saggio Folin Ciocalteu.

Concentrazione <u>SUCCO DI FRUTTA</u> [mL/L]	Assorbanza (A_{760nm})	$R^2 = 0.999$
0.50	0.0729	Pendenza= 0.117 \pm 0.002 Intercetta= 0.03 \pm 0.01 $S_{x/y} = 0.017$
1	0.143	
2	0.278	
4	0.515	
10	1.19	

Tabella 6.18 indice GAE dei composti investigati

Dal rapporto tra le pendenze delle rette di calibrazione del succo di frutta e dell'acido gallico, si valuta poi il valore dell'indice GAE:

$$GAE = \frac{0.117}{0.107} = 1.09$$

Da cui si evince che il campione di succo di frutta, in concentrazione 1mL/L, presenta una concentrazione di polifenoli totali pari a 1,09 mg/L di acido gallico equivalente.

Considerando la propagazione dell'incertezza, dovuta al rapporto tra la pendenze, si ha:

$\text{GAE} = 1.1 \pm 0.1$

Sono state eseguite poi 3 ripetizioni della concentrazione 1mL/L di succo di frutta, da cui si è ricavato il valore medio di 0,95mg/mL di acido gallico equivalente (950 mg/L); attraverso la retta dei minimi quadrati, al valore medio può essere associata l'incertezza :

$\text{GAE} = 1.0 + 0.1 \text{ mg/mL}$
--

Il valore calcolato, si discosta di molto da quello indicato nell'etichetta del succo di frutta; molto probabilmente, il motivo è legato al fatto che il reattivo di Folin-Ciocalteu, ossida oltre ai composti polifenolici, anche la vitamina C, la vitamina E ed il glucosio, comportando un forte errore sistematico in eccesso.

6.5) Approccio Potenzimetrico.

L'approccio potenziometrico, consiste nel titolare una soluzione contenente quantità note della coppia redox ferricianuro/ferrocianuro, con aggiunte di volumi noti di una soluzione standard di antiossidante.

Il punto finale della titolazione, in cui tutto il $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ è completamente ridotto a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$, viene valutato effettuando la derivata prima e seconda della curva di titolazione, per ricavare rispettivamente il punto di massimo e di flesso. Dal punto finale della titolazione si determina poi il numero di $\mu\text{equivalenti}$ di antiossidante necessari a titolare il $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Anche in questo caso sono state costruite delle rette di risposta graficando il ΔE in funzione delle moli di antiossidanti aggiunte, e il valore di TEAC è stato calcolato sempre tramite il rapporto tra la pendenza della retta del composto di interesse e la pendenza della retta del Trolox® (tabella 6.19).

Per l'acido ascorbico, si è ottenuta la seguente retta di risposta:

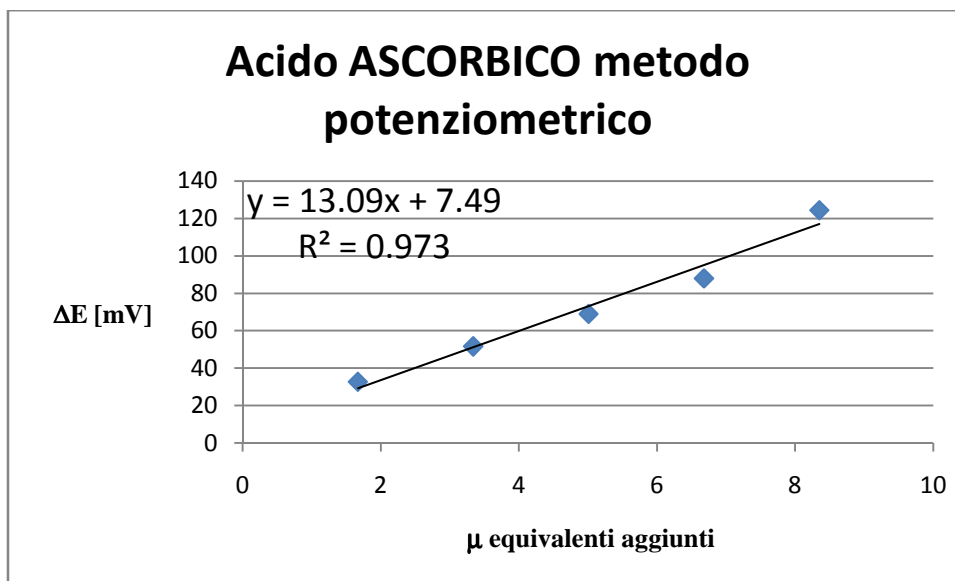


Figura 6.30 Retta di calibrazione (L)-Acido ascorbico.

Diagrammando poi tutte le rette di calibrazione per le 5 molecole esaminate, si ottiene il seguente grafico, da cui poi ricavare gli indici TEAC e stilare una classifica della capacità antiossidante.

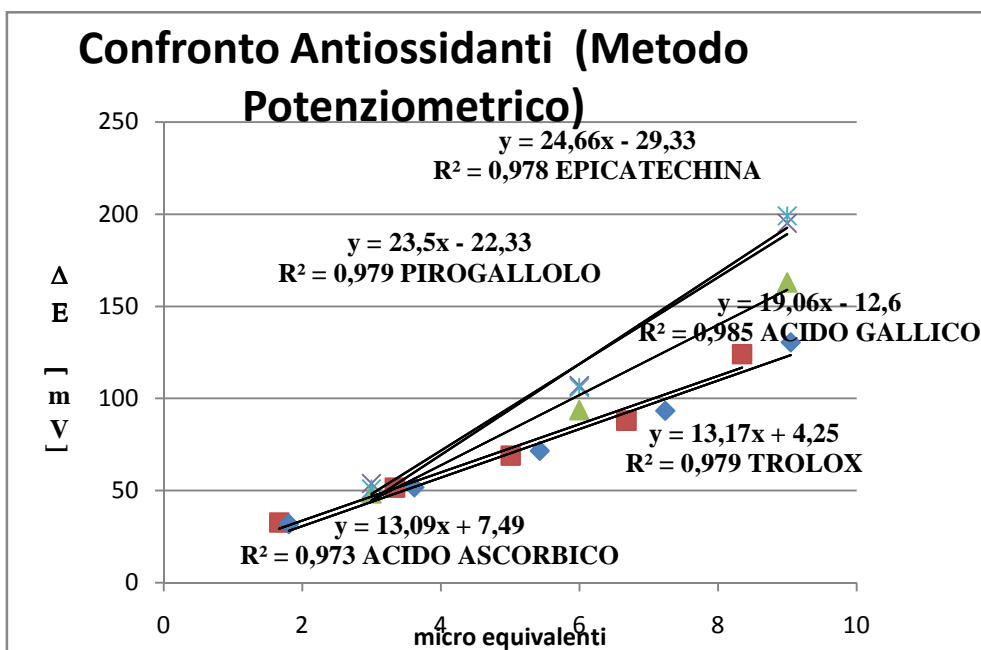


Figura 6.31 Confronto antiossidanti col metodo Potenzimetrica.

Gli indici TEAC, vengono riportati, con apposita incertezza, nella tabella che segue:

Composto	Indice TEAC
Trolox®	1.0 + 0.1
(L)-Acido Ascorbico	1.0 ± 0.1
Acido Gallico	1.4 ± 0.2
Pirogallolo	1.8 ± 0.3
(-)-Epicatechina	1.9 ± 0.3

Tabella 6.19 indice TEAC dei composti investigati(metodo potenziometrico).

Anche il metodo potenziometrico di Brainina et al[39], come il saggio ABTS e DPPH, non è in grado di discriminare la capacità antiossidante tra Trolox® ed acido ascorbico, che risultano essere pressochè analoghi.

In questo caso le specie di natura fenolica, risultano essere quelle più facilmente ossidabili dal composto $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, e quindi quelle con più elevata capacità antiossidante.

Come anche per molti degli altri saggi precedentemente descritti, la (-)-epicatechina, si dimostra essere un composto antiossidante estremamente efficiente.

CAPITOLO 7

RISULTATI E DISCUSSIONE.

CONFRONTO TRA LE VARIE METODOLOGIE PER LA DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE.

Il parametro TEAC, valutato con le diverse metodiche analitiche, non è un valore univoco, ma è dipendente dal tipo di radicale impiegato e dalla procedura utilizzata per valutare la capacità antiossidante. Considerando queste differenze, una valutazione esauriente della capacità antiossidante su uno stesso campione reale, richiederebbe la determinazione dell'indice TEAC con diverse metodologie [11]. Per comprendere meglio le potenzialità del metodo messo a punto, è stata effettuata una comparazione dei nostri risultati con quelli ottenuti per gli antiossidanti testati con le metodologie sopra citate, sulla base dell'indice TEAC.

Il confronto tra i due metodi è stato eseguito valutando i coefficienti R^2 , relativi alle rette di correlazione ottenute col metodo dei minimi quadrati [50].

Lo scopo di questo confronto è quello di cercare e valutare quale dei metodi standardizzati ed ampiamente utilizzati, si avvicina di più al metodo elettrochimico proposto in questo lavoro di tesi. Successivamente, il confronto dei vari indici TEAC per i vari metodi sperimentati, è stato esteso anche al campione reale di succo di frutta.

7.1) Confronto indici TEAC tra ABTS e metodo elettrochimico.

Dal confronto tra gli indici TEAC tra il saggio ABTS ed il metodo elettrochimico emerge un grado di correlazione molto limitato, testimoniato dal valore di $R^2=0.415$ in tabella 7.1.

Composto	Metodo Elettrochimico	ABTS
(L)-Acido ascorbico	0.37 ± 0.04	0.97 ± 0.03
Acido gallico	0.36 ± 0.03	2.90 ± 0.05
Pirogallolo	0.50 ± 0.07	3.35 ± 0.04
(-)-Epicatechina	0.84 ± 0.08	3.67 ± 0.04
R^2	0.415	

Tabella 7.1 Confronto indici TEAC tra metodo elettrochimico e ABTS.

Il motivo di questo comportamento, deriva dalla diversa natura dei radicali utilizzati nelle due diverse metodologie. Nella nostra metodologia utilizziamo il radicale OH, fortemente reattivo e generabile solamente in loco, mentre l'ABTS radicale è stabile anche in soluzione acquosa, l'elettrone spaiato è centrato sull'azoto e presenta una reattività molto minore. Quindi i composti indagati presentano una reattività completamente diversa nei due diversi saggi: nei confronti del radicale OH \cdot il Trolox[®] agisce da chain breaking evolvendo ad una struttura chinonica con rottura di anello, mentre col radicale ABTS^{•+} il meccanismo che avviene è di semplice cessione di un atomo di idrogeno. Un'altra anomalia si riscontra nel comportamento dei 3 composti fenolici, in quanto il saggio ABTS non è in grado di discriminarne la loro capacità antiossidante che risulta essere pressochè analoga e di gran lunga superiore rispetto ai composti vitaminici. Per tutte queste differenze riscontrate, il saggio ABTS, non può essere correlato col metodo elettrochimico proposto.

7.2) Confronto indici TEAC tra DPPH e metodo elettrochimico.

Il confronto tra gli indici TEAC del metodo elettrochimico e del DPPH vengono riportati in tabella 7.2:

Composto	Metodo Elettrochimico	DPPH
(L)-Acido ascorbico	0.37 \pm 0.04	0.97 \pm 0.04
Acido gallico	0.36 \pm 0.03	1.55 \pm 0.07
Pirogallolo	0.50 \pm 0.07	1.47 \pm 0.04
(-)-Epicatechina	0.84 \pm 0.08	2.52 \pm 0.09
R²	0.840	

Tabella 7.2 Confronto indici TEAC tra metodo elettrochimico e DPPH.

La tabella 7.2 mostra un buon grado di correlazione lineare ($R^2 = 0.84$) tra gli indici TEAC delle due tecniche in questione, per quel che riguarda i composti puri esaminati.

Il grado di correlazione lineare è più pronunciato rispetto alla metodologia ABTS ed i possibili motivi di questa analogia nel confronto tra gli indici TEAC, potrebbero derivare dal fatto che il radicale DPPH \cdot sia dotato di una reattività abbastanza sostenuta e di gran lunga superiore rispetto a quella dell'ABTS^{•+}.

Per quel che riguarda i confronti coi composti puri, il DPPH come metodologia, può essere relazionata col metodo elettrochimico proposto.

7.3)Confronto indici TEAC tra ORAC e metodo elettrochimico.

Il confronto tra gli indici TEAC del metodo ORAC e di quello elettrochimico proposto, è indicato in tabella 7.3.

Composto	Metodo Elettrochimico	ORAC
(L)-Acido ascorbico	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.02
Acido gallico	0.36 ± 0.03	1.04 ± 0.05
Pirogallolo	0.50 ± 0.07	1.05 ± 0.06
(-)-Epicatechina	0.84 ± 0.08	2.74 ± 0.08
R²	0.910	

Tabelle 7.3 Confronto indici TEAC tra metodo il elettrochimico ed il saggio ORAC.

La metodologia ORAC presenta la miglior correlazione con il nostro metodo elettrochimico, indicata da un $R^2 = 0.91$. Probabilmente questa forte analogia deriva dalla procedura analoga con la quale viene valutata la capacità da parte di una specie antiossidante, cioè la capacità di proteggere dall'azione ossidante radicalica un particolare substrato: nel caso del metodo elettrochimico il film polifenolico, per l'ORAC la fluoresceina. Un'altra analogia può riguardare la tipologia di radicali adottati, entrambi rientrano nella categoria dei ROS, ed entrambi sono accumulati dal fatto di presentare una elevata reattività ed un chimismo simile.

7.4)Confronto indici TEAC tra metodo potenziometrico e metodo elettrochimico.

Viene riportato il confronto tra gli indici TEAC per il metodo elettrochimico e quello potenziometrico (tabella 7.4). I valori di TEAC valutati con i due diversi metodi non presentano una buona correlazione, come indicato da un R^2 pari a 0.543.

Composto	Metodo Elettrochimico	Metodo Potenziometrico
(L)-Acido ascorbico	0.37 ± 0.04	1.0 ± 0.1
Acido gallico	0.36 ± 0.03	1.4 ± 0.2
Pirogallolo	0.50 ± 0.07	1.8 ± 0.3
(-)-Epicatechina	0.84 ± 0.08	1.9 ± 0.3
R^2	0.543	

Tabella 7.4 Confronto indice TEAC tra metodo elettrochimico e potenziometrico.

Si può notare come il grado di correlazione lineare sia molto limitato, anche in questo caso uno dei possibili motivi con cui spiegare la mancata correlazione, deriva dalle enormi diversità delle 2 metodologie: in una, la degradazione avviene ad opera del radicale idrossilico, nell'altra non si ha alcuna generazione di radicali in situ, ma la sola specie ossidante è $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, per cui la capacità antiossidante non è vista come la capacità di inibire o spegnere dei radicali, quanto il fatto di saper ridurre il $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$.

7.4) Confronto indici TEAC e VCEAC per il campione reale.

È stato poi eseguito un confronto tra gli indici TEAC e VCEAC (vitamina C equivalente), ricavati con il metodo elettrochimico e i saggi ABTS, DPPH e ORAC su un campione reale, costituito da un succo di frutta.

Per il confronto si è calcolato anche l'indice VCEAC, perchè esso presenta un maggiore interesse commerciale. I due indici, espressi rispettivamente come μmol di Trolox®/acido ascorbico equivalente per millilitro di succo, sono mostrati in figura 7.1

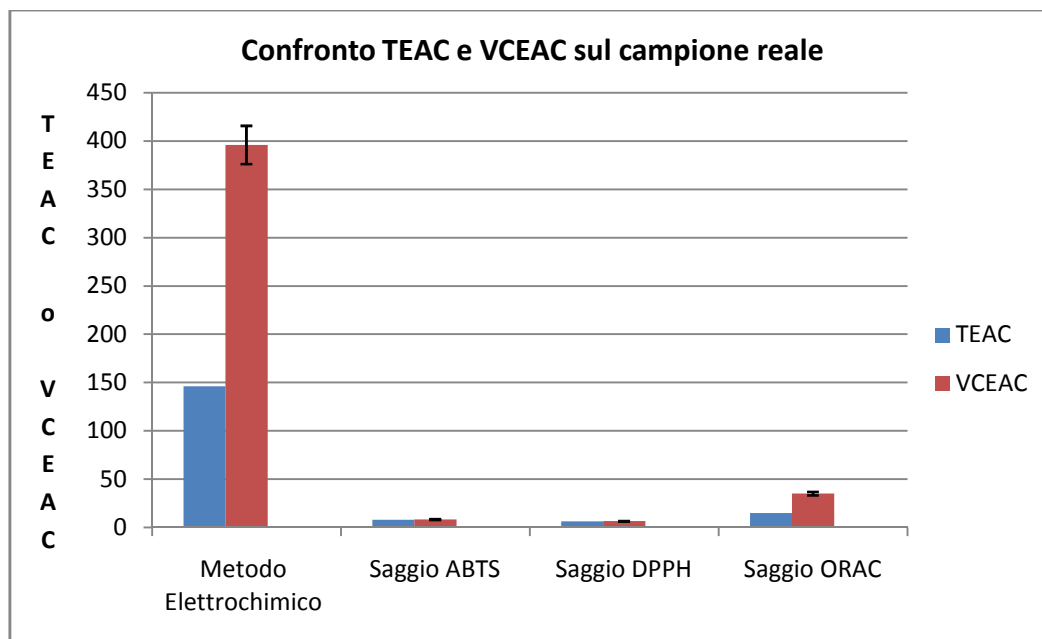


Figura 7.1. Confronto tra gli indici TEAC e VCEAC di un succo di frutta, valutati con il metodo elettrochimico, l'ORAC, l'ABTS e DPPH.

Dalla figura 7.1 si nota che per l'analisi del campione reale, solamente il saggio ABTS e il saggio DPPH presentano valori paragonabili, probabilmente a causa delle forti analogie tra i due radicali utilizzati. I valori di TEAC e VCEAC analizzati con il nostro metodo sono i più elevati, mentre i valori registrati con metodo ORAC sono intermedi.

Possiamo osservare, inoltre, come il valore di indice TEAC ricavato dai vari metodi sia legato alla reattività del radicale utilizzato nel saggio: maggiore è la reattività del radicale, maggiore è l'indice TEAC calcolato. Il radicale $\text{OH}\cdot$ utilizzato nel nostro metodo riesce a reagire con un numero elevato di molecole e quindi attaccherà anche componenti presenti nel succo di frutta non propriamente definiti come antiossidanti, in tal modo darà origine a un valore di TEAC superiore agli altri. Analogamente il radicale alchil perossile, utilizzato nell'ORAC, è più reattivo rispetto ai radicali DPPH e ABTS, e quindi reagisce con un maggior numero di composti presenti nel campione reale rispetto ai radicali all'azoto, sopra descritti. La problematica associata alla presenza di sostanze reattive, oltre agli antiossidanti, in campioni complessi è stata riscontrata in altre metodologie che cercano di valutare la capacità antiossidante nei confronti del radicale $\text{OH}\cdot$. Secondo Hilgemann et al. e Ou et al. non è più possibile fare una correlazione tra metodi che sfruttano il radicale $\text{OH}\cdot$ e i metodi che sfruttano altre tipologie di radicali, quando si analizzano campioni reali.

8)CONCLUSIONI.

Durante lo svolgimento del lavoro di tesi abbiamo applicato una metodologia per la rivelazione del radicale $\text{OH}\cdot$, basata sulla degradazione di un film polifenolico sintetizzato su un elettrodo di glassy carbon, al fine di sviluppare un saggio analitico per la determinazione della capacità antiossidante. Le prove effettuate hanno mostrato come il metodo presenti prestazioni adeguate per la valutazione della capacità antiossidante relativa a composti largamente adottati come riferimento in letteratura.

La degradazione del film polifenolico in presenza di antiossidanti mostra due fasi: una prima fase di induzione in cui non si osserva in pratica alcuna degradazione e una seconda fase in cui, degradato completamente l'antiossidante, si osserva la rimozione del film dalla superficie elettrodica. Il parametro analitico utilizzato per la determinazione della capacità antiossidante è il tempo di induzione, in quanto risulta il più ripetibile e più linearmente correlato alla concentrazione di antiossidante rispetto agli altri parametri utilizzati. La capacità antiossidante è stata espressa attraverso il parametro TEAC, ottenuto dal rapporto tra i coefficienti angolari delle rette di calibrazione del composto testato e del Trolox®, impiegato in tutti i metodi standard come riferimento per l'espressione dell'AOC. La metodologia analitica è stata applicata alla determinazione della capacità antiossidante di un campione reale.

Gli indici TEAC così calcolati sono stati confrontati con quelli ottenuti impiegando metodologie analitiche standardizzate e ampiamente utilizzate, quali saggio ABTS, saggio DPPH, saggio ORAC e saggio potenziometrico basato sulla coppia ferricianuro/ferrocianuro. Dalle correlazioni ottenute con i vari metodi è emerso che la metodologia sviluppata fornisce risultati in linea con la metodologia ORAC, che del resto è quella che presenta le maggiori analogie con il metodo da noi sviluppato. Gli indici TEAC calcolati per il campione reale con il metodo proposto evidenziano valori più elevati rispetto a quelli determinati con le altre metodologie, probabilmente a causa della maggiore reattività del radicale $\text{OH}\cdot$ che reagisce con numerose specie, non propriamente antiossidanti, presenti nel campione alimentare.

La metodologia analitica è stata applicata con successo alla determinazione della capacità antiossidante di composti puri, tuttavia appare evidente che alcuni aspetti necessitano di una più approfondita e accurata riflessione, supportata dalla acquisizione di ulteriori dati sperimentali. Tra questi, l'aspetto più importante è sicuramente l'introduzione di un sistema

tampone durante la prova, anche se esso può portare ad una diminuzione della sensibilità analitica e all'introduzione di nuovi radicali all'interno del sistema di misura.

8). BIBLIOGRAFIA.

- [1]Harmann D, “ Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry”, *Journal of Gerontology*,1956, 11, 298-300;
- [2]Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., “Free radical- induced damage to DNA: mechanism and measurement, *Free Radical Biol. Med.*, 2002, 32, 1102-1115;
- [3]Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer P., Fenn W., “Oxygen poisoning and X-irradiation- A mechanism in common , *Science*, 1954, 119, 623-626;
- [4]Cadenas, E., Packer, L., “ Handbook of antioxidants”, Dekker, New York 2001;
- [5]Lee J., Koo N., Min D.B., “Reactive Oxygen Species, aging, and antioxidative nutraceuticals comprehensive, *Rev. Food Sci Safety*, 2004, 3, 21-23;
- [6]Gutteridge, J.M.C., Nagy, I.Z., Maidt, L., Floyd, R.A., “ADP-Iron as a Fenton reactant: Radical reactions detected by a spin trapping, hydrogen abstraction and aromatic hydroxylation, *Arch. Biochem. Biophys*, 1990, 277, 422-424;
- [7]Kehrer, J.P., “The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity”, *Toxicology*, 2000, 149, 43-50;
- [8]Girotti, A.W., Korytowski W., “Cholesterol as a singlet oxygen detector in biological systems”, *Methods in enzymology*, 2000, 319, 85-100;
- [9]Cervellati, R., “Nuovi argomenti di chimica per l’insegnamento”, Franco Angeli Editore, 2010;
- [10] Valko, M., Leibfritz D., Moncol, J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”, *Chemico-Biological interactions*, 2006, 1, 1-40;
- [11]Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., “Methods for testing antioxidant activity”, *The Analyst*, 2002, 127, 183-198;
- [12]A.I.M. “Fondamenti di Scienza dei Polimeri”, Pacini Editore, Pisa.
- [13]Hong-Yu Zhang, Da Peng Yang, Guang Yan Tang, “Multipotent antioxidants: from screening to design”, *Drug Discovery Today*, 2006, 11, 749-754;
- [14]Cappelli P., Vannucchi V., “Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione”, Zanichelli, Bologna 2005;
- [15]Brigelius-Flohè et al., “The European perspective on Vitamin E current knowledge and future research, *Am.J.Clin.Nutr*, 2002, 76, 704;
- [16]Valgimigli, L., Brigati, G., Pedulli G.F., Di Labio G.A., Mastragostino, M., Arbizzanti,C., Pratt, D.A., *Chem. Eur.J.* 2003, 9, 4997-5010;

- [17]Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S., "Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities", Food. Anal. Methods, 2009, 2, 41-60;
- [18]Huang, D., Ou, B., Prior, R., "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 1841-1856;
- [19]Prior, R., Wu, X., Scaich, K., "Standardized Methods for the determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements", J. Agric. Food Chem., 2005, 53, 4290-4302;
- [20]Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C., "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data", Free Radical Biol. Med., 2000, 29, 1106-1114;
- [21]De La Rosa, L.A., Alvarez- Parrilla, E., Gonzalez Aguilar, G., "Fruit and vegetable phytochemicals", Wiley-Blackwell, 2010;
- [22]Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants", Free Radical Biol. Med. 1993, 14, 303-311;
- [23]Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., " Development and validation of of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe", J. Agric. Food Chem., 2001, 49, 4619- 4926;
- [24]Zulueta, A., Esteve, M., Frigola, A., "ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products", Food Chem., 2009, 114, 310-316;
- [25]www.garnier.it (USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity of selected foods);
- [26]Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship", Free Radical Biol. Med., 1997, 22, 749-760;
- [27]Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R.L., Huang, D., "Novel fluorimetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe", J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 2772-2777;
- [28]Benzie, I.F., Strain, J. J., "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.", Anal. Biochem., 1996, 239, 70-76.
- [29]Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S.J., "Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human plasma by controlled peroxidation-the important contribution made by plasma proteins", FEBS Lett. 1985, 187, 33-37;

- [30]Frankel, E. N., Meyer, A.S., “The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants”, *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1925-1941;
- [31]Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Yang, M., Rice-Evans, C., “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biol. Med.*, 1999, 26, 1231-1237;
- [32]Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G., “Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids”, *Free Radical Biol. Med.*, 1996, 20, 933-956;
- [33]Molyneux, P., “The use of the stable radical diphenyl-picryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity”, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26, 211-219;
- [34]Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset. C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995, 28, 25-30;
- [35]Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset. C., “Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method”, *Lebensm. Wiss. Technol.* 1997, 30, 609-615;
- [36]Folin, O., Ciocalteu, V., “Tyrosine and tryptophan determinations in proteins”, *J. Biol. Chem.*, 1927, 73, 672-649;
- [37]Singleton, V.L., Rossi, J., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16, 144-158;
- [38]Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent”, *Methods Enzymol.*, 1999, 299, 152-178;
- [39]Brainina, K. Z., Ivanova, A. V., Sharafutdinova, E.N., Lozovskaya, E. L., Shkarina, E.I., “Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation”, *Talanta*, 2007, 71, 13-18;
- [40]Scholz, F., Lopez de Lara Gonzalez, G., Machado de Carvalho, L., Hilgemann, M., Brainina, K.Z., Kahlert, H., Smail Jack, R., Truong Minh, D., “Indirect electrochemical sensing of radicals and radical scavengers in biological matrices”, *Angew. Chem.*, 2007, 46, 8079-8081;
- [41] Hilgemann, M., Scholz, F., Kahlert, H., Machado de Carvalho, L., Barcellos da Rosa, M., Lindequist, U., Wurster, M., do Nascimento, P., Bohrer, D., “Electrochemical assay to quantify the hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts”, *Electroanalysis*, 2010, 22, 406-412;
- [42]Gattrell, M., Kirk, D.W., “A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the passive film produced during aqueous acidic phenol electro-oxidation”, *J. Electrochem. Soc.*, 1992, 139, 2736-2743;

- [42]Harris, D.C., “Chimica analitica quantitativa”, seconda edizione, Zanichelli, 2005;
- [43]Miller, J.C., Miller, J.N., “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”, Sixth Edition, Pearson, 2010;
- [44]Bard, A.J., Faulkner, L.R., “Electrochemical Methods, fundamentals and applications”, Second Edition, Wiley, 2001;
- [45]Dunford, H.B., “Oxidations of iron (II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme”, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 233-234, 311-318;
- [46]Bielsky, B.H.J., Cabelli, D.E., Arudi, R.L., “Reactivity of HO_2/O_2^- Radicals in Aqueous Solution”, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1985, 14, 1041-1048;
- [47]Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z., Scheerens, J., Miller, A.R., “Modified 2,2-Azino-bis-3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) Methods”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 1151-1157;
- [48]Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moyà, M.L, Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C., “Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, 2007, 71, 230-235;
- [49]Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., “A procedure to measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols”, *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76, 270-276;
- [50]Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., “Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19, 669-675;
- [51]OxiselectTM Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) Activity Assay, Product Manual;
- [52]Dae Ok-Kim, Ki Won Lee, Hyong Joo Lee, Chang Yong Lee, “Vitamin C Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals”, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 3713-3717.
- [53]Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidants status in premature neonates”, *Clin. Sci.*, 1993, 84, 407-412;

10)RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la prof.ssa Domenica Tonelli e il Dott. Isacco Gualandi, per la dedizione e l'assistenza continua, che mi hanno dedicato per la stesura di questo lavoro di tesi.

Un ringraziamento va anche a tutti i ragazzi del laboratorio con i quali mi sono confrontato nel difficile lavoro della ricerca e ho trascorso assieme a loro un periodo di lavoro che difficilmente non dimenticherò.

